Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, sub-área Microbiología
PEDECIBA

-

Identificación y caracterización de Coronavirus y Alfavirus en murciélagos de Uruguay

Lic. Lucia Moreira Marrero

-

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

Sección Virología - Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Montevideo, Uruguay.

2023

Índice

Agradecimientos 4
Abreviaturas 5
Resumen 8
1. Introducción 10
Virus emergentes y murciélagos 10
Interfaz virus-murciélago-humano 11
Generalidades de los murciélagos 13
Murciélagos como reservorios de virus 15
Filogenia y evolución 15
Vuelo y migración 15
Letargo, hibernación y longevidad 16
Vivir en colonia: estructura, tamaño de la población y ecolocalización 17
Inmunología 18
Estudios sobre murciélagos y virus en Uruguay 19
Familia Coronaviridae 21
Generalidades de la familia 21
Características del virión y del genoma 21
Ciclo replicativo 22
Subfamilia Orthocoronavirinae 24
Epidemiología y origen zoonótico de los coronavirus humanos 25
Coronavirus reportados en murciélagos del Nuevo Mundo 27
Familia Togaviridae 29
Generalidades de la familia 29
Alfavirus de importancia en la región, sus ciclos enzoóticos y epizoóticos 30
Características del virión y del genoma 33
Ciclo replicativo 35
Rol de los murciélagos 36
Alfavirus en Uruguay 37
2. Objetivos 38
Objetivo general 38
Objetivos específicos 38
3. Materiales y Métodos 39

3.1 Colecta de muestras de murciélagos *39*
3.1.1 Captura de los murciélagos *39*
3.1.2 Toma de muestras *39*
3.1.3 Conservación de la muestra *41*
3.1.4 Extracción de material genómico *41*
3.1.5 Retrotranscripción (RT) *41*
3.2. Ensayos para detección de coronavirus *41*
3.2.1 Primer protocolo (Chu et al., 2011) *42*
3.2.2 Segundo protocolo (Vijgen et al., 2008) *42*
3.2.3. Tercer protocolo (Quan et al., 2010) *42*
3.2.4 Cuarto protocolo (Anthony et al., 2015) *43*
3.3 Ensayos para detección de alfavirus *43*
3.3.1. Análisis de alfavirus en murciélagos *43*
3.3.2. Análisis de alfavirus en mosquitos *46*
3.3.3. Capturas de mosquitos *46*
3.3.4. Procesamiento de los mosquitos *47*
3.3.5. Extracción de ARN total y análisis moleculares *48*
3.4. Análisis de los productos de amplificación *48*
3.4.1. Electroforesis *48*
3.4.2. Secuenciación y análisis filogenéticos *48*
3.5. Puesta a punto de ensayos de titulación de alfavirus en cultivo celular *49*
3.5.1. Línea celular y generación de stock viral de RNV *49*
3.5.2. Titulación de RNV *50*
3.5.3. Plaqueo viral *50*
3.5.4. TCID50% *50*
4 Resultados 52
Colecta de muestras *52*
Retrotranscripción *55*
Ensayos Coronavirus *55*
Detección en murciélagos *55*
Tamizaje por PCR *55*
Secuenciación y análisis filogenético *56*
Ensayos Alfavirus *59*

Detección en murciélagos *59*
Tamizaje por PCR *59*
Análisis de secuencias *61*
Procesamiento de mosquitos *62*
Detección de alfavirus en pooles de mosquitos Tamizaje por PCR *63*
Análisis de secuencias *63*
Análisis filogenéticos de alfavirus de murciélagos y mosquitos *65*
Puesta a punto de titulación de alfavirus en cultivo celular *67*
5 Discusión 69
De los resultados del estudio de coronavirus en murciélagos *69*
De los resultados de alfavirus en murciélagos, mosquitos y titulación viral *71*
6 Conclusiones 77
7 Perspectivas 79
8 Bibliografía 80
9 Apéndice 89
Hibridación de cebadores *89*
Ensayos Coronavirus *89*
Ensayos Alfavirus *91*
Artículos publicados durante el desarrollo de esta tesis *92*
10 Anexo 93
Secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos *93*
Ensayos Coronavirus *93*
Ensayos Alfavirus *95*

Agradecimientos

A mis tutoras, Sandra y Adriana, les agradezco por orientarme y compartir generosamente sus conocimientos durante todos estos años. Su confianza en mí, así como la oportunidad que me brindaron de participar en nuevos proyectos y crecer en mis áreas de interés, ha sido invaluable.

Al tribunal conformado por Natalia Echeverría, Mariana Cosse y Adrián Díaz, les agradezco sinceramente por aceptar evaluar esta tesis y por dedicar su tiempo a proporcionar comentarios y sugerencias que enriquecieron notablemente este trabajo.

A todo el equipo del PCMU, quiero expresar mi gratitud por el compañerismo, las salidas y la pasión que todos compartimos por el estudio de estos fascinantes animales. Sobre todo, Mari, Juan D, Juan O, Mica, Santi R y Germán con quienes compartí las salidas, congresos y reuniones siempre con entusiasmo y risas. Agradezco especialmente a Germán, cuyas contribuciones en términos de muestras, mapas y conocimiento sobre los murciélagos fueron fundamentales para esta tesis.

A mis compañeros y compañeras de la Sección Virología, de antes y de ahora, quienes me han ayudado y acompañado a lo largo de los años, en los experimentos, en la escritura de esta tesis, con palabras de aliento, consejos y apoyo total, ¡gracias! Flo O, Flo C, Marcie, Feli, Maby, Santi C, Nati R, Nati M, Mabe, Sandra y Adri.

Agradezco a Mónica Remedios de la Sección Entomología de Facultad de Ciencias, por su invaluable ayuda en la clasificación de los mosquitos.

A mis amigas y amigos, quiero expresar mi profundo agradecimiento por su constante cuidado, comprensión y apoyo. Han respetado mis tiempos y momentos de ausencia por estudio, y han depositado en mí una confianza que a menudo supera la que tengo en mí misma.

Finalmente, a mi familia, principalmente a Mamá, Papá y Vale. Quiero expresar mi profundo agradecimiento por su constante impulso, por su amor, apoyo y confianza en todos mis proyectos. Siempre han celebrado mis logros, sin importar cuán peculiares o inusuales fueran, y han brindado todo el entusiasmo necesario para seguir adelante.

Y a mi Risu, por llegar al comienzo de esta maestría, y ser mi compañera incondicional.

“Que jamás deje de aprender y pensar, de vivir y aprender con una lucidez, una comprensión y un amor siempre renovados”
Silvia Plath

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia, producto de la Retrotranscripción.
Ae.	*Aedes.*
AICOM	Área de Importancia para la Conservación de los Murciélagos.
aLRT	Prueba de razón de verosimilitud aproximada, del inglés *likelihood ratio test.*
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNmc +	Ácido ribonucleico monocatenario sentido positivo.
AlfaCoV	Alfacoronavirus.
ATB	Antibiótico.
BatCoV	Coronavirus asociados a murciélagos, del inglés *Bat Coronavirus.*
BetaCoV	Betacoronavirus.
BLAST	Herramienta bioinformática, del inglés *Basic Local Alignment Search Tool.*
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América, del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*
CHIKV	Virus Chikungunya.
CoV	Coronavirus.
CO_2	Dióxido de carbono.
Cx.	*Culex.*
dNTPs	Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados.
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco.
DeltaCoV	Deltacoronavirus.
DTT	Ditiotreitol, para estabilizar enzimas y otras proteínas con grupos de sulfhidrilos libres.
ECP	Efecto citopático.
EEEV	Virus de la Encefalitis Equina del Este, del inglés *eastern equine encephalitis virus.*
EMEM	Medio mínimo esencial con sales de Earl, del inglés *Eagle Minimal Essential Medium.*
ERGIC	Compartimento intermediario retículo-Golgi, del inglés *ER-Golgi intermediate compartment.*
GammaCoV	Gammacoronavirus.
g	Gramos.
h	Hora.
HCoV	Coronavirus humano.
HV	Herpesvirus.
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus, del inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses.*

Kb	Kilobases = 10^3 pares de bases.
Km	Kilómetros.
MADV	Virus Madariaga.
min	Minutos.
MERS	Síndrome respiratorio del Oriente Medio, del inglés *Middle East respiratory síndrome.*
mL	Mililitros.
mM	Milimolar.
MPM	Marcador de peso molecular.
nm	Nanómetros.
nsP	Gen de la polimerasa de ARN dependiente de ARN, del inglés *no structural protein*
Oc.	*Ochlerotatus.*
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés *Open reading frame.*
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*.
pb	Pares de bases.
PCMU	Programa para la Conservación de los Murciélagos de Uruguay.
PIXV	Virus Pixuna.
pmol	Picomoles = 10^{-12} moles.
PRNT	Prueba de neutralización por reducción de placas.
RABV	Virus de la rabia.
RdRp	*RNA-dependent RNA polymerase.*
RE	Retículo endoplasmático.
RELCOM	Red Latinoamericana y del Caribe para la Conservación de los Murciélagos.
RNV	Virus de Río Negro.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT	Retrotranscripción.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa antecedida por una Retrotranscripción.
s	Segundos.
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo, del inglés *severe acute respiratory syndrome*
SFB	Suero fetal bovino.
SICOM	Sitio de Importancia para la Conservación de los Murciélagos.
TAE	Tris-acetato EDTA.
TCID50	Dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%, del inglés *Tissue Culture Infectious Dose*.
UV	Luz ultravioleta.
WEEV	Virus de la encefalitis equina del oeste, del inglés *western equine encephalitis virus*
°C	Grados Celsius.
µL	Microlitro.

5’cap Casquete o caperuza, estructura típica de ARNm eucariótico que presenta nucleótido de guanina ligado al ARNm mediante un inusual enlace trifosfato 5'-5'.

Resumen

La emergencia de un virus capaz de causar una epidemia puede ser explicada por una combinación de factores, como la aparición de nuevas variantes genéticas, adaptación a nuevos vectores y hospedadores, o factores ecológicos que pueden influir en la dispersión de vectores y/o individuos infectados. Desde hace varios años se conoce un amplio rango de vectores y reservorios asociados a la propagación de virus ARN de alto impacto. Entre ellos, los murciélagos han sido identificados como reservorios de rhabdovirus, paramyxovirus y coronavirus, entre otros. También se les ha involucrado en el ciclo biológico de varios arbovirus como los alfavirus. Los murciélagos (Orden Chiroptera) representan el 20% de los mamíferos con más de 1400 especies reportadas al momento, constituyendo el grupo más diverso y geográficamente disperso de mamíferos. En Uruguay se han identificado 22 especies pertenecientes a las familias Vespertilionidae, Molossidae y Phyllostomidae, con tres tipos de dieta: insectívora, frugívora y hematófaga. Debido a su gran diversidad y distribución cosmopolita resulta interesante estudiar los virus asociados a ellos. Recientemente hemos detectado genoma de 2 alfavirus diferentes: virus Río Negro (RNV) y el virus de la encefalitis equina del este (EEEV) en hisopados orales de murciélagos insectívoros. Estos virus fueron previamente reportados en equinos y mosquitos de nuestro país. El objetivo de este trabajo fue avanzar en el conocimiento de la diversidad viral presente en los murciélagos del Uruguay, identificar y caracterizar virus con potencial zoonótico o emergente como los coronavirus y profundizar en la caracterización de alfavirus, explorando el rol de los murciélagos como posibles participantes en el ciclo natural de los mismos. Para ello, se procesaron un total de 329 muestras de hisopados orales y anales provenientes de individuos de 12 especies de murciélagos insectívoros y hematófagos colectados en 12 departamentos de nuestro país, entre los años 2017 y 2022.

Se detectó por primera vez en Uruguay un alfacoronavirus asociado a murciélagos (Alfa-BatCoV) a partir de una muestra de hisopado oral de un murciélago insectívoro de la especie *Molossus molossus*, colectado en Palmares de Caranday (Río Negro) en 2019. Mediante análisis filogenético, se encontró que este virus estaba estrechamente relacionado con variantes detectadas previamente en murciélagos de la misma especie en Brasil y Argentina. Hasta el momento, en Uruguay solo se tenía conocimiento de la circulación de coronavirus bovinos y aviares, los cuales son agentes causantes de infecciones gastrointestinales y respiratorias en el ganado y aves. Por lo tanto, la detección de un Alfa-BatCoV en murciélagos es un hallazgo novedoso y relevante para el estudio de la diversidad viral en la región. Este resultado representa una prevalencia del 0,3%, similar a las reportadas en otras investigaciones en el análisis de coronavirus a partir de hisopados orales.

Se realizó la detección e identificación genómica de 2 alfavirus diferentes en hisopados orales y anales de murciélagos capturados en 8 departamentos de Uruguay. El análisis filogenético identificó al virus RNV en 7 especies diferentes:*Tadarida brasiliensis* (n= 8),*Molossops temminckii* (n= 1), *Molossus molossus* (n= 1), *Myotis spp.* (n= 6), *Eptesicus montanus* (n= 1), *Eptesicus furinalis* (n= 3) y *Desmodus rotundus* (n= 1); y el virus EEEV linaje I en murciélagos de 2 especies: *Myotis spp.* (n= 1) y *Eumops bonariensis* (n= 1). Además, para comprender mejor la dinámica de la circulación de alfavirus en el país, se realizaron capturas de mosquitos cercanos a las colonias de murciélagos para detección del genoma viral. A partir de éstos, se detectó RNV en 2 *pooles* correspondientes a mosquitos *Ae. (Oc.) albifasciatus* capturados en la localidad de Paso Pache (Florida), en primavera y verano del 2022. En resumen, los resultados sugieren que los alfavirus RNV y EEEV se encuentran

circulando en mosquitos y murciélagos de nuestro país al menos desde el año 2015. Como perspectiva a futuro, es necesario continuar con los estudios serológicos y otros estudios adicionales para definir el rol de los murciélagos en posibles ciclos enzoóticos, actuando como hospedadores amplificadores o finales.

En conclusión, el descubrimiento de coronavirus y alfavirus asociados a murciélagos en Uruguay amplía nuestro conocimiento sobre la diversidad viral en la región y la dinámica espaciotemporal de la circulación viral, con importantes aplicaciones para la conservación y manejo de poblaciones de murciélagos. Además, destaca la importancia de continuar estudiando la presencia de estos virus en diferentes especies y tipos de muestras para comprender mejor su epidemiología y su potencial impacto en la salud pública y animal.

1. Introducción

Virus emergentes y murciélagos

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes en los humanos y la vida silvestre representan una amenaza creciente para la salud pública, la salud de los ecosistemas y la biodiversidad (Jones et al., 2008; Plowright et al., 2008). La mayoría de estas infecciones son zoonosis con origen en la vida silvestre (transmitidas entre animales vertebrados y humanos) y se han incrementado con el tiempo (Luis et al., 2013). La emergencia de un virus capaz de causar una epidemia puede ser explicada por una combinación de factores, como la aparición de nuevas variantes genéticas, adaptación a nuevos vectores y hospedadores, o factores ecológicos que pueden influir en la dispersión de vectores y/o individuos infectados (Allen et al., 2017; Plowright et al., 2011, 2017). Desde hace varios años, se conoce un amplio rango de vectores y reservorios que están asociados a la propagación de virus ARN de alto impacto sanitario. Estos virus tienen una alta incidencia como zoonosis, lo cual podría deberse en buena parte a la elevada tasa de error en las polimerasas dependientes de ARN, lo que facilita la adaptación viral a nuevos hospedadores (Mollentze & Streicker, 2020; Schountz, 2014).

Los murciélagos han sido reconocidos como importantes hospedadores de diversas enfermedades zoonóticas emergentes, como los paramyxovirus Nipah y Hendra, ambos transmitidos por murciélagos frugívoros del género *Pteropus* (Plowright et al., 2011). Además, se les ha asociado con los coronavirus SARS y MERS, así como con los filovirus Ébola y Marburg, los cuales han tenido gran impacto por las enfermedades que causan (Brook & Dobson, 2015; Luis et al., 2013; Quan et al., 2013). También son reservorios de la mayoría de los lyssavirus conocidos, incluyendo el virus de la rabia (RABV) (Serra-Cobo & López-Roig, 2017). Otros virus como algunos alfavirus, orthoflavivirus y orthobunyavirus pueden infectar a los murciélagos a través de artrópodos, aunque aún no se comprende completamente el papel que juegan en la persistencia y transmisión de estos virus en la naturaleza (Barrantes Murillo et al., 2022; Calisher et al., 2006; Schountz, 2014).

Un estudio comparativo ha identificado que los murciélagos hospedan más virus zoonóticos por especie que los roedores, causándoles poca o ninguna enfermedad aparente, planteando la interrogante de si los murciélagos son únicos en su capacidad de albergar virus y por qué. En base a esto, se han propuesto diferentes hipótesis sobre los factores ecológicos y de historia de vida que promueven la riqueza viral zoonótica en los murciélagos (Luis et al., 2013). Muchas son las interrogantes que surgen sobre el papel de los murciélagos como reservorio de virus: ¿cómo es la dinámica de los virus en las poblaciones de murciélagos? ¿cuáles son los factores de riesgo y cómo abordar las tareas de prevención? entre otras. Para dilucidarlas se requiere un enfoque multidisciplinario que tenga en cuenta una amplia gama de factores bióticos y abióticos, además de la complejidad de los ambientes naturales, del virus y del organismo hospedador (Serra-Cobo & López-Roig, 2017).

Interfaz virus-murciélago-humano

La aparición de enfermedades zoonóticas emergentes puede estar relacionada con diversos factores que involucran a los patógenos, los hospedadores y el ambiente, tales como la mutación genética y la recombinación viral, los cambios en las poblaciones del reservorio o de los vectores intermediarios, las alteraciones en el comportamiento social y demográfico humano, y los factores ambientales. Para que un patógeno pueda transmitirse desde el reservorio al nuevo hospedador, debe atravesar múltiples barreras que conforman un cuello de botella. Estas barreras y condiciones son únicas para cada patógeno, lo que hace que la transmisión de enfermedades zoonóticas sea un evento poco frecuente ya que se requiere la conjunción de factores ambientales, biológicos y geográficos específicos (David M. Morens et al., 2004; Parrish et al., 2008; Plowright et al., 2017).

La fase de exposición es un paso muy importante, la cual se ve afectada por la distribución del hospedador, su separación geográfica, ecología, comportamiento del hospedador, grados de contacto y la ruta de transmisión de patógenos. La distribución geográfica de los reservorios se ve afectada por el comercio y caza de la vida silvestre, e introducción de especies domésticas en ambientes naturales que aumentan el contacto entre los animales silvestres y/o sus virus con los animales domésticos y humanos. Por otra parte, actividades humanas como la urbanización, deforestación y expansión agrícola, así como los viajes y prácticas agrícolas promueven el cambio de hospedador viral de animales a humanos (Parrish et al., 2008). Existe también el riesgo de un fenómeno de derrame inverso conocido como zooantroponosis, donde los patógenos se transmiten desde los humanos hacia la vida silvestre, causando morbilidad y/o mortalidad en estos animales. Este tipo de transmisión es más común en especies con las que tenemos una mayor interacción, como aquellas que son carismáticas, longevas, se encuentran en cautiverio o están bajo una vigilancia estricta, por ejemplo, se detectó SARS-CoV-2 en tigres del zoológico del Bronx, EE. UU en 2020. Sin embargo las implicaciones ecológicas y de salud pública de esta transmisión aún no están completamente claras (Fagre et al., 2022).

La emergencia del virus Nipah en Malasia (1998 – 1999) tipifica el proceso de propagación y emergencia de muchas de las zoonosis asociadas a murciélagos, e ilustra la influencia de los comportamientos humanos y las perturbaciones ambientales en las infecciones humanas emergentes. Los murciélagos frugívoros (*Pteropus sp.)* cuyos hábitats habían desaparecido debido a la deforestación, se vieron atraídos a las granjas de cerdos criados en corrales ubicados cerca de los huertos, esto puso en contacto a los cerdos con el excremento de los murciélagos que contenían henipavirus. Debido al hacinamiento se produjeron fases de transmisión explosiva entre cerdos, y en última instancia la infección pasó a los manipuladores de los cerdos (Figura 1) (Morens et al., 2004). Una forma de evitar que esta situación se repita es mediante la conservación y restauración del hábitat de alimentación de los murciélagos frugívoros (zonas forestales productivas durante el invierno y primavera), lo que reduciría el estrés nutricional y la colonización de áreas urbanas por parte de los murciélagos, y consecuentemente el contacto indirecto con los humanos (Plowright et al., 2014).

Luego de la fase de exposición entre el hospedador donante y el nuevo hospedador el patógeno se enfrenta a las barreras de defensa propias del organismo y la probabilidad de que se establezca una infección va a estar determinada por su interacción y la dosis del patógeno (relación

dosis-respuesta). Estas barreras varían según el patógeno, las características del hospedador, y la receptividad individual. Las barreras físicas incluyen la piel, las membranas mucosas, la mucosidad, el ácido estomacal y el tropismo celular. Luego de ingresar a las células diana, se enfrenta a la respuesta inmunológica innata, a la presencia/ausencia de los componentes necesarios para la replicación o la transmisión a otras células. Por lo tanto, el estado genético, inmunológico y fisiológico del hospedador también puede modular la relación dosis-respuesta. Si el patógeno logra replicarse y diseminarse, el resultado de la infección puede variar desde una eliminación subclínica hasta la muerte del nuevo hospedador, o desde una infección como hospedador final, hasta una infección sostenida que se transmite entre los nuevos hospedadores. Aunque las barreras pueden variar entre patógenos, especies hospedadoras y receptividad individual, las interacciones entre ellas son poco conocidas. En situaciones donde las barreras varían de manera dinámica en el tiempo y el espacio, la conjunción de todas ellas puede ser fugaz y el desbordamiento puede parecer aleatorio (Plowright et al., 2017).

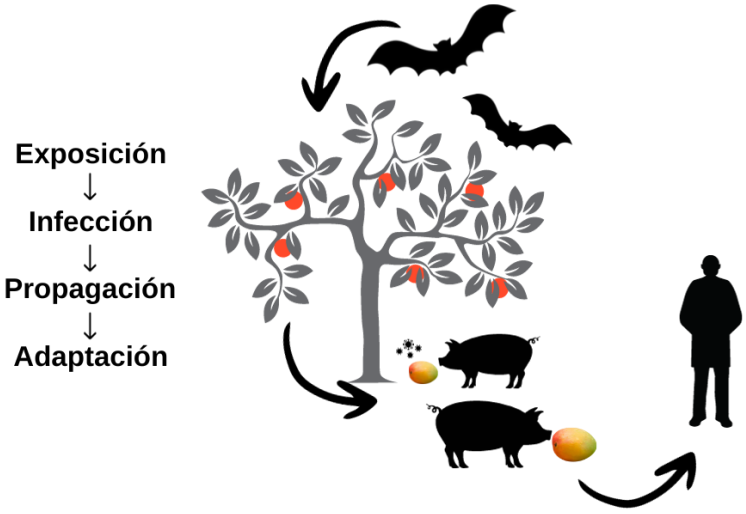


Figura 1. Diagrama de las fases de emergencia de un virus zoonótico y ejemplo del escenario de exposición del virus Nipah (*Paramyxoviridae*) en Cerdos en Malasia (1998-1999), basado en Parrish et al., (2008). El desbordamiento de virus de murciélagos requiere que se den una serie de condiciones jerárquicas: i y ii los reservorios deben estar presentes e infectados; generalmente se propagan por transmisión indirecta por lo que el virus debe sobrevivir fuera del hospedador reservorio/donante y tener acceso al nuevo hospedador; además los nuevos hospedadores deben ser susceptibles y estar expuestos a cantidades suficientes del virus para establecerse una infección (Plowright et al., 2014). El del ciclo de transmisión del virus Nipah en Malasia ejemplifica estas series de condiciones de transmisión viral: los murciélagos frugívoros (*Pteropus sp*.) que son el reservorio natural del virus, se vieron atraídos a las granjas de cerdos criados en corrales ubicados cerca de los huertos, esto puso en contacto a los cerdos con el excremento de los murciélagos que contenían henipavirus. Debido al hacinamiento se produjeron fases de transmisión explosiva entre cerdos, y en última instancia la infección pasó a los manipuladores de los cerdos (Morens et al., 2004).

Por lo antes expuesto, la exploración y caracterización de posibles virus zoonóticos tiene el potencial de brindar información de referencia. Aunque muchos de ellos pueden no causar enfermedades en sus hospedadores naturales y su capacidad de infección y patogenicidad en otras especies es desconocida, el descubrimiento y estudio de estos virus sirve como una guía importante

para la salud pública. Es fundamental identificar las barreras de la infección y las perturbaciones asociadas, entender el contexto microbiológico y ambiental, y comprender los vínculos funcionales y cuantitativos entre los determinantes de la propagación en tiempo y espacio. Todo esto puede proporcionar una valiosa herramienta para prevenir o predecir eventos de derrame (transmisión de virus desde animales vertebrados a humanos) (Plowright et al., 2017).

Existen evidencias de detección y aislamiento en murciélagos de una gran cantidad de virus de diferentes familias, sin embargo, es un campo todavía por explorar en Uruguay, aquí nos centraremos en el primer estudio de los coronavirus en murciélagos del país y profundizaremos en nuestros conocimientos previos sobre la presencia de alfavirus en dichos hospedadores. Cabe resaltar que la identificación de virus emergentes en murciélagos puede tener impactos importantes en sus poblaciones, aumentando la percepción pública negativa que se tiene sobre ellos y dificultando los esfuerzos de conservación (Voigt & Kingston, 2015). Por lo tanto, se abordará desde un enfoque multidisciplinario entre virología, ecología y conservación, teniendo en cuenta el contexto de las detecciones virales asociadas a murciélagos encontradas.

Generalidades de los murciélagos

Los quirópteros (orden Chiroptera) conocidos comúnmente como murciélagos son considerados, luego de los roedores, el segundo orden de mamíferos más abundantes y ampliamente distribuidos del mundo. Se clasifican en dos subórdenes Yinpterochiroptera (familias *Rhinolophoidea* y *Pteropodidae*) y Yangochiroptera (todas las demás familias de murciélagos) (Figura 2), y representan aproximadamente el 20% de los mamíferos vivos con más de 1400 especies (Simmons et al., 2023). Se encuentran en todo el mundo a excepción de las regiones polares extremas y son los únicos mamíferos capaces de volar por vuelo batido. Demuestran una gran diversidad, con numerosas especies descriptas, pueden alimentarse de insectos, otros mamíferos, sangre, peces, frutas, néctar y polen; y la mayoría utiliza la ecolocalización para orientarse y localizar presas (Calisher et al., 2006).

Gracias a todas esas características proporcionan servicios ecosistémicos claves, siendo grandes dispersores de semillas y polinizadores a lo largo de grandes distancias, ayudando a reforestar bosques después de la tala y a polinizar plantas de gran importancia para la alimentación humana y de otras especies (muchas especies de plantas con flores dependen exclusivamente de los murciélagos para su reproducción y dispersión), impulsando así la salud de los ambientes en toda su área de distribución (Teeling et al., 2018). Además, actúan como controladores naturales de insectos plaga de cultivos y posibles transmisores de enfermedades; el guano es utilizado como fertilizante natural; y se han desarrollado sistemas de sonar basados en la ecolocalización y el procesamiento de señales de los murciélagos (Calisher et al., 2006; Cleveland et al., 2006; Teeling et al., 2005, 2018).

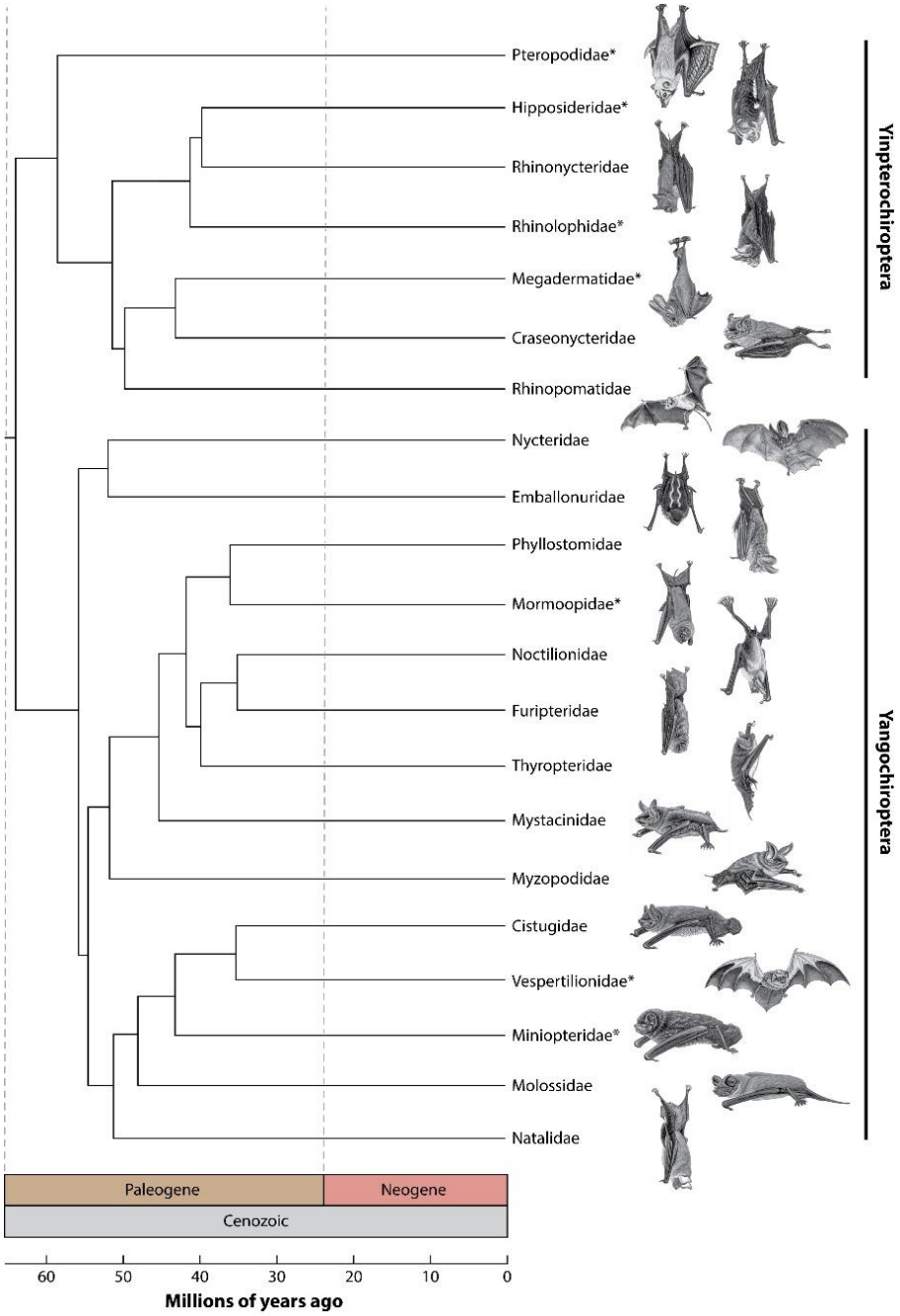


Figura 2. Árbol filogenético consenso del orden Chiroptera y los tiempos de divergencia. Se señala la división de los dos subórdenes por los cuales está compuesto el orden: Yinpterochiroptera y Yangochiroptera (Teeling et al., 2018).

Murciélagos como reservorios de virus

Los murciélagos presentan un conjunto de características singulares que los distinguen de otros mamíferos. Entre estas características se encuentran su capacidad para volar largas distancias, sus hábitos migratorios y gregarios, así como su longevidad en relación a su pequeño tamaño. Estos aspectos resultan relevantes al considerar el papel de los murciélagos en el mantenimiento, transmisión y dispersión de virus zoonóticos (Brook & Dobson, 2015; Calisher et al., 2006). A continuación, se resumen algunas de estas características y rasgos que los distinguen de otros mamíferos y pueden hacerlos más propensos para hospedar virus.

Filogenia y evolución

Se estima que el orden Chiroptera se originó hace unos 64 millones de años (Figura 2) lo que sugiere un largo proceso de coevolución entre murciélagos y virus (Serra-Cobo & López-Roig, 2017; Teeling et al., 2018). El origen antiguo de los henipavirus y lyssavirus mantenidos por murciélagos, podría indicar una larga historia de coespeciación. Estos virus y otros que evolucionaron junto con los murciélagos, pueden haber utilizado en su ciclo de replicación rutas bioquímicas y receptores celulares que se encuentran conservados en mamíferos que evolucionaron más tarde, lo que podría mejorar la transmisión de estos virus asociados a murciélagos hacia otros mamíferos (Calisher et al., 2006; Luis et al., 2013).

La hipótesis del "reservorio especial" refiere a que las barreras para la transmisión de patógenos entre especies aumentan a medida que se incrementa la divergencia evolutiva entre los humanos y otros animales. Sin embargo, a pesar de la distancia evolutiva de los murciélagos, los rasgos fisiológicos y/o ecológicos de este taxón son lo que los hacen más propensos a mantener virus zoonóticos y transmitirlos a los humanos. Estos factores los diferencian de otros mamíferos terrestres como los roedores, que también son importantes reservorios zoonóticos (Mollentze & Streicker, 2020; Voigt & Kingston, 2015).

Vuelo y migración

Una de las características que distinguen a los murciélagos del resto de los mamíferos es la capacidad de vuelo sostenido, lo que les proporciona una mayor movilidad respecto a otros mamíferos terrestres y el potencial para adquirir y propagar ampliamente los virus (Calisher et al., 2006; Serra-Cobo & López-Roig, 2017). A diario pueden volar largas distancias en busca de alimento o incluso realizar movimientos migratorios estacionales, por ejemplo, el murciélago africano de la fruta (*Eidolon helvum*) en el cual se han encontrado anticuerpos neutralizantes contra el virus del Ébola-Zaire, migra más de 2500km desde la selva tropical en la estación seca hacia áreas de sabana en la estación lluviosa, y se sugiere que puede tener un papel importante en la propagación de ciertos filovirus (Serra-Cobo & López-Roig, 2017). El murciélago de cola libre (*Tadarida brasiliensis*), una especie colonial que habita en cuevas, migra aproximadamente 1200 km desde sus refugios en Texas y Nuevo México a sus sitios de hibernación en México (Calisher et al., 2006; Serra-Cobo & López-Roig, 2017). En Uruguay, *T. brasiliensis* muestra una variación en la proporción de sexos en comparación con las épocas frías y estivales, lo que sugiere que las hembras migran fuera de

Uruguay en invierno, mientras que los machos permanecen activos en los refugios durante todo el año (Botto Nuñez et al., 2018).

Letargo, hibernación y longevidad

Los murciélagos son heterotermos y tienen la capacidad de entrar en torpor diario (disminución de la actividad fisiológica), de varios días, o hibernación para sobrevivir a los períodos estacionales de bajos recursos. Esta adaptación fisiológica y conductual es una característica importante de los murciélagos de zonas templadas de las familias Vespertillionidae, Rhinolophidae, y Molossidae (Calisher et al., 2006; Serra-Cobo & López-Roig, 2017). Los estudios de patogenia en estos períodos de conservación de energía muestran que hay muchos virus que pueden causar infecciones persistentes como ciertos lyssavirus y orthoflavivirus sin causarles enfermedad. En un estudio, Sulkin & Allen (1974), sometieron a murciélagos marrones grandes (*Eptesicus fuscus*) y murciélagos marrones pequeños (*Myotis lucifugus*) infectados con el virus de la encefalitis japonesa (JEV) a diferentes temperaturas simulando el período de hibernación, los resultados mostraron que mantuvieron la viremia de 95 a 108 días sugiriendo que las temperaturas frías suprimen las respuestas inmunitarias que de lo contrario controlarían la viremia (Calisher et al., 2006).

Otra característica particular es que presentan una longevidad extrema con respecto a su pequeño tamaño, la edad máxima promedio para murciélagos de zonas templadas es de 25 años, con un récord de longevidad de 38 años en un macho de *Myotis brandtii,* la cual presenta un peso aproximado de 8 g (Wilkinson & South, 2002). La relación entre la tasa metabólica y el peso corporal indica la esperanza de vida para los mamíferos, quedando los murciélagos fuera de esta línea de regresión tradicional (Calisher et al., 2006; Serra-Cobo & López-Roig, 2017). La estrategia de historia de vida de los murciélagos es lenta, con tasas de supervivencia más altas, maduran a edades más avanzadas y tienen menos crías por año que las especies con historias de vidas rápidas, resultando más longevos que la mayoría de las especies de mamíferos del mismo tamaño (por ejemplo, ratones). La hibernación también está asociada con altas tasas de supervivencia anual lo que está relacionado con la coevolución de rasgos que indican historias de vida lentas. Por lo tanto, la longevidad extrema junto con las infecciones virales persistentes y comportamiento de descanso generalmente gregario puede ayudar a mantener los virus por más tiempo y transmitirlos intra e inter especies y a otros vertebrados (Calisher et al., 2006; Serra-Cobo & López-Roig, 2017).

Vivir en colonia: estructura, tamaño de la población y ecolocalización

La estructura y tamaño de las poblaciones de murciélagos varían de pocos a miles de individuos, según la especie, estación y localización de los refugios. Estos mamíferos pasan gran parte de su vida en los sitios de descanso, por lo tanto, las condiciones micro climáticas de los mismos van a influir en los ciclos de vida como la preñez, la lactancia y la hibernación. Estas condiciones varían entre verano e invierno, provocando el movimiento de diferentes poblaciones y conectándolas entre sí. A menudo algunas colonias pueden estar compuestas por múltiples especies (Serra-Cobo & López-Roig, 2017). Por ejemplo, en la Usina de Cuñapirú (Rivera, Uruguay) se encuentra la colonia de murciélagos insectívoros más grande del país con aproximadamente 20.000 individuos, compuesta por *T. brasiliensis* y *Myotis spp.* (Figura 3). Dentro de los túneles de la usina ambas especies forman parches individuales, pero también se las ha observado formando parches mixtos (Genta et al., 2017; Botto Nuñez et al., 2019b). Según el Dr. G. Botto, en esta colonia maternal se ha observado un comportamiento de cuidado inter especie de las crías (comunicación personal, 2019). El gran número individuos de diferentes especies y el comportamiento gregario con contacto físico directo y también de su orina y excremento, puede facilitar la entrada y propagación de virus entre ejemplares de especies distintas y entre colonias donde hay intercambio de individuos, sobre todo si son migratorios (Serra-Cobo & López-Roig, 2017).

Figura 3. Colonia mixta de *T. brasiliensis y Myotis spp.* en Uruguay. Derecha arriba: se puede observar un parche de individuos de las dos especies en contacto estrecho la una con la otra. Usina Cuñapirú, Rivera (noviembre 2022) Foto: Lucia Moreira. Izquierda *T. brasiliensis*. Foto: Germán Botto. Derecha abajo: *Myotis sp*. Foto: Juan Manuel Ordoqui.

La ecolocalización también es un rasgo único de los murciélagos con respecto a otros mamíferos terrestres. La producción de los sonidos por la laringe, impulsados por los músculos abdominales y emitidos por la boca o fosas nasales, podría generar pequeñas gotas o aerosoles de moco o saliva. Esto puede servir como medio de transmisión de virus entre individuos que se encuentran muy cerca, como en los refugios de las grandes colonias. Por ejemplo, en las Cavernas de Carlsbad y la Cueva Frio, Estados Unidos, se encuentran poblaciones de millones de individuos de *T. brasiliensis*, allí se reportó el único caso documentado de transmisión por aerosoles del virus de la rabia (Calisher et al., 2006).

Inmunología

El área de la inmunología de murciélagos cuenta aún con escasez de información, el estudio en colonias cautivas representa un gran desafío por lo que la mayor parte de los estudios son realizados en colonias salvajes en sus entornos naturales o en entornos de laboratorio. Esto limita la investigación experimental de la respuesta inmune contra los virus que albergan. Sin embargo, comprender cómo los murciélagos pueden coexistir con una gran diversidad viral sin causarles enfermedad es de gran interés, el avance en esta área podría ayudar a desarrollar terapias para humanos, animales de compañía o el ganado (Baker et al., 2013; Schountz, 2014).

Aparte de algunos lyssavirus como el virus de la rabia o el virus Tacaribe (arenavirus) que causó la muerte de muchos murciélagos *Artibeus sp.* en Trinidad y Tobago en la década de 1950, no se han confirmado otros virus que causen signos clínicos de enfermedad en murciélagos. Aunque esto también puede observarse con algunos virus en roedores, la alta diversidad viral y la baja virulencia sugieren que los murciélagos podrían haber desarrollado otros mecanismos para controlar la replicación viral más eficazmente (Schountz, 2014). Una de las teorías explica que el aumento de la temperatura corporal y de la tasa metabólica durante el vuelo simula la fiebre y podría servir de adyuvante evolutivo para el sistema inmune como herramienta selectiva de los virus que los infectan, controlando la virulencia y promoviendo la diversidad viral. El aumento de las tasas metabólicas en murciélagos durante el vuelo es de hasta 16 veces más comparado con el reposo y la temperatura corporal alcanzada en el vuelo es similar a la alcanzada durante la fiebre en el resto de los mamíferos (entre 38 y 41°C). Esto podría ayudar en el costo que representa aumentar el metabolismo al momento de activar la respuesta inmune innata y protegerlos en la primera etapa de la infección, ya que es comparativamente insignificante frente al costo metabólico que se produce durante el vuelo (Baker et al., 2013; O'Shea et al., 2014; Schountz, 2014).

Se han identificado genes seleccionados positivamente en el origen de la capacidad de vuelo de los quirópteros. En la evolución de estos mamíferos, se observó el surgimiento simultáneo de ciertos cambios genéticos relacionados al sistema inmune innato, necesarios para reparar el daño del ADN frente a las grandes tasas metabólicas producidas durante el vuelo, lo que les permitiría reparar los daños provocados por los subproductos del metabolismo oxidativo (Serra-Cobo & López-Roig, 2017). Estos cambios resultaron en una inmunotolerancia aumentada y una eliminación incompleta en cuanto a la capacidad de controlar la replicación viral a través de la inmunidad innata, además de un aumento en la longevidad y la disminución en la producción de tumores (O'Shea et al., 2014; Serra-Cobo & López-Roig, 2017; Voigt & Kingston, 2015; Zhang et al., 2013).

Con respecto a los componentes celulares del sistema inmune, se han identificado células dendríticas foliculares, macrófagos, linfocitos B y T con características similares a las de otros mamíferos, así como también eosinófilos, neutrófilos y basófilos y otros componentes del sistema inmune innato y adaptativo (Baker et al., 2013).

Estudios sobre murciélagos y virus en Uruguay

En Uruguay hay identificadas 22 especies de murciélagos que representan 3 familias: Vespertilionidae, Molossidae y Phyllostomidae. De estas, 19 son insectívoras, 2 frugívoras y una hematófaga. El territorio uruguayo representa el límite austral de la distribución de varias especies como *Platyrrhinus lineatus, Sturnira lilum, Myotis riparius* (ahora *Myotis pampa* (Novaes et al., 2021)) *y Promops centralis*. En general la distribución de las especies es heterogénea pero en conjunto cubren todo el territorio del país (Tabla 1) (Botto Nuñez et al., 2019b).

Tabla 1. Lista de especies de Uruguay, su distribución y dieta (Botto Nuñez et al., 2019b).

Familia	Especie	Distribución en el país	Dieta
Vespertillionidae	*Myotis albescens*	Todo el país	Insectívora
	Myotis levis	Todo el país	
	Myotis nigricans	Registros puntuales	
	Myotis pampa	Región centro-norte	
	Eptesicus furinalis	Todo el país	
	Eptesicus diminutus	Restringida al noroeste	
	Eptesicus montanus	Todo el país	
	Eptesicus velatus	Región centro-este	
	Lasiurus blosevilli	Todo el país	
	Lasiurus villosissimus	Todo el país	
	Lasiurus ega	Todo el país	
Molossidae	*Eumops bonariensis*	Todo el país	Insectívora
	Eumops patagonicus	Restringida al norte	
	Nyctinomops laticaudatus	Registros puntuales	
	Molossops temminckii	Restringida al noroeste	
	Molossus molossus	Todo el país	
	Molossus rufus	Restringida al norte	
	Promops centralis	Registros puntuales	
	Tadarida brasiliensis	Todo el país	
Phyllostomidae	*Desmodus rotundus*	Todo el país	Hematófaga
	Platyrrhinus lineatus	Restringida al norte	Frugívora
	Sturnira lilium	Restringida al norte	Frugívora

Con respecto al estado de conservación, se identificaron cuatro amenazas principales en Uruguay: la *producción de energía eólica* debido al riesgo de traumatismo y barotrauma; el *control de rabia/caza control* debido a la eliminación intencional de las colonias cuando se confirman casos positivos de rabia en murciélagos (además de incrementar la percepción negativa en la población); el *turismo/perturbación de los refugios naturales* ya que las colonias son vulnerables a actividades dentro de los refugios como el turismo espeleológico, recolección de guano e investigación, incluso

en actividades puntuales; y la *pérdida de hábitat* por eliminación de bosques, urbanización, obras de infraestructura y expansión agropecuaria (Botto Nuñez et al., 2019b). Los Sitios y Áreas de Importancia para la Conservación de los Murciélagos (SICOMs y AICOMs) son creados como parte de la estrategia regional de la Red Latinoamericana y del Caribe para la Conservación de los Murciélagos (RELCOM) para la conservación de estos mamíferos (Aguirre et al., 2014). Al momento, Uruguay cuenta con 2 SICOMs (Usina de Cuñapirú y Gruta Arequita) y 3 AICOMs (Palmares de Caranday, Parque Municipal Grutas de Salamanca y Montes e Islas del Rio Uruguay) (Diaz et al., 2018; Diaz & Botto, 2018a, 2018b; Genta et al., 2017).

El estudio de virus en murciélagos de Uruguay comenzó con el análisis del virus de la rabia (RABV) debido a que, en 2007 luego de 25 años sin casos, se reportó un brote de rabia paralítica en el norte del país que afectó a bovinos y equinos. El principal foco de infección fue el vampiro común (*Desmodus rotundus*), la única especie hematófaga presente en Uruguay, que también fue la más afectada durante las campañas de control mediante la reducción de sus colonias. Adicionalmente, se detectó molecularmente por primera vez RABV en murciélagos insectívoros autóctonos, como *T. brasiliensis, Molossus sp.* y *Myotis spp.* (Guarino et al., 2013; Botto Nuñez et al., 2019a). Además, se encontraron anticuerpos neutralizantes en los sueros de murciélagos *D. rotundus* mediante la prueba de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT, por sus siglas en inglés) (Botto Nuñez, 2010). Estudios posteriores sugieren que el resurgimiento y expansión de la rabia en el país fue debido a cambios en las condiciones ambientales o de la distribución del reservorio, lo que pudo promover la transmisión y persistencia del virus (Botto Nuñez et al., 2019a).

Posteriormente, nuestro equipo llevó a cabo un estudio innovador en el país, donde identificamos y caracterizamos herpesvirus (HV) en murciélagos hematófagos e insectívoros. Durante el estudio, se detectó una amplia variedad de Gamma-HV y Beta-HV en muestras de hisopados orales en murciélagos de 8 especies distintas (*D. rotundus, M. temminckii, M. molossus, M. rufus, T. brasiliensis, E. diminutus, E. furinalis y Myotis spp*.). Los HV identificados presentaron una alta diversidad genética y, en base a la filogenia obtenida, algunos de ellos podrían incluso ser nuevos HV de murciélagos en comparación con las secuencias de HV de otras especies de vertebrados (Moreira Marrero et al., 2021).

Recientemente, hemos reportado la detección e identificación genómica de virus de dos especies diferentes dentro del género Alfavirus en hisopados orales de murciélagos insectívoros capturados en el norte del país: el virus Río Negro (RNV, complejo VEEV) en *T. brasiliensis y Myotis spp*., y el virus de la encefalitis equina del este (EEEV) en *Myotis spp*. Estos hallazgos, junto con estudios previos de nuestro grupo que identificaron RNV y EEEV mediante la detección del genoma viral en mosquitos y anticuerpos neutralizantes en equinos, sugieren que estos alfavirus pueden estar circulando en ciclos enzoóticos en nuestro país (Burgueño et al., 2018; Moreira Marrero et al., 2022).

Familia *Coronaviridae*

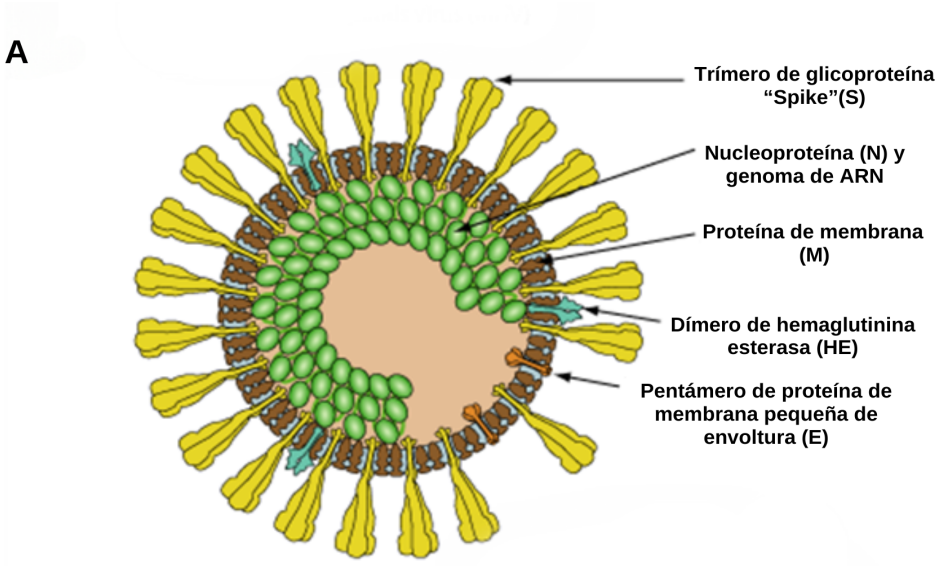
Generalidades de la familia

La familia *Coronaviridae* (Orden Nidovirales) incluye 3 subfamilias (*Letovirinae*, *Orthocoronavirinae* y *Pitovirinae*) y son los virus de genoma ARN lineal monocatenario de polaridad positiva (ARNmc (+)) envueltos, más grandes reportados al momento. Afectan una amplia gama de hospedadores vertebrados como mamíferos, aves y peces. Los coronavirus (CoV) humanos (HCoV) están asociados principalmente a enfermedades respiratorias y gastrointestinales, mientras que los CoV en otras especies (por ejemplo, bovinos, aves, cerdos, gatos y perros) causan enfermedades respiratorias, entéricas, inmunológicas o hepáticas graves (Poon et al., 2005; Woo et al., 2023).

Características del virión y del genoma

Los viriones son esféricos de 80 a 160 nm y suelen tener proyecciones en la superficie, correspondientes a la proteína espiga (S); al observarse a la microscopía electrónica estas se ven como una corona solar. Esta estructura es la que le da el nombre a los "verdaderos" CoV, recientemente agrupados en la subfamilia *Orthocoronavirinae*; adicionalmente, esta nomenclatura fue adoptada para dar nombre a toda la familia viral (Figura 4A) (Poon et al., 2005; Woo et al., 2023).

El genoma viral de 22 a 36 kb de longitud está poliadenilado y asociado a proteínas formando un complejo ribonucleoproteico. Presenta al menos 5 marcos abiertos de lectura (ORFs) principales: los no estructurales, ORF1a y ORF1ab, se traducen directamente en una poliproteína replicasa; y los estructurales se expresan en glicoproteínas de espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y de la nucleocápside (N), la cual es interna y se une al ARN viral (Figura 4B). Para el ensamblaje del virión se necesita un conjunto mínimo de las proteínas integrales de membrana E y M (Flint et al., 2015; Poon et al., 2005; Woo et al., 2023).



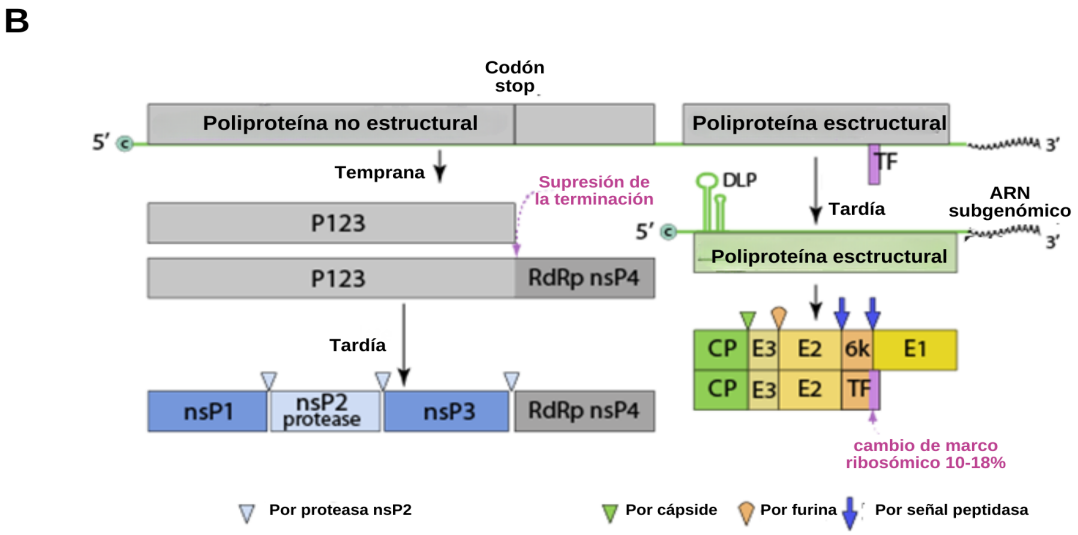


Figura 4. Esquema general de la estructura del virion y del genoma de los CoV (*Coronaviridae*) (A) Esquema del virion. El complejo ribonucleoproteico (ARN + proteína N) forma la nucleocápside (helicoidal para la sub familia *Orthocoronavirinae*), rodeada por la envoltura donde se insertan las glicoproteínas S, que le da forma de corona, las proteínas de membrana (M), y los pequeños pentámeros de proteínas (E). **(B) Organización del genoma.** Genoma monocatenario de ARN (+) de 27 a 32kb de un CoV humano (HCoV-229E), donde se muestran los ORFs como cuadros. El ARN genómico se traduce para formar las poliproteínas pp1a y pp1ab, que se procesan para formar la ARN polimerasa. Las proteínas estructurales están codificadas por ARNm anidados que comparten una secuencia líder común en 5'. Solo se traduce el primer marco de lectura abierto de cada ARNm. Modificado de ViralZone (https://viralzone.expasy.org/30).

Ciclo replicativo

Los CoV utilizan la proteína S para ingresar a las células a través del proceso de endocitosis. Esta proteína es responsable de la unión al receptor y la fusión de la membrana celular, lo que puede ocurrir en la superficie celular o dentro de los endosomas, dependiendo del tipo de virus. En ciertos CoV de aves y mamíferos, S es escindida en S1 y S2 por una proteasa, separando así las funciones de unión y fusión. Los CoV utilizan una amplia variedad de receptores celulares para ingresar a las células, y algunos CoV humanos como el SARS-CoV-2, usan la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), una peptidasa de zinc presente en la superficie celular (Li et al., 2005; Poon et al., 2005).

La fusión de las membranas es inducida por un cambio en el pH endosomal, lo que resulta en la liberación de la nucleocápside al citoplasma, dando inicio al ciclo de replicación viral dentro de las fábricas virales. Una vez liberado en el citoplasma, el ARN viral actúa como ARNm para las replicasas y también como molde para la síntesis del ARN intermediario de polaridad negativa (Flint et al., 2015). En primer lugar, los ORF1a y ORF1b (el segundo codificado por un cambio de marco ribosómico) se traducen directamente desde el ARN genómico en 2 poliproteínas (pp1a y pp1ab), las cuales son procesadas para formar la polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp) junto con otras proteínas no estructurales involucradas en la síntesis de ARN. Las proteínas estructurales, por otro lado, son codificadas por un conjunto de ARNm subgenómicos anidados que comparten una

secuencia líder 5' común y un extremo 3'-poli(A). La síntesis de estos ARNm subgenómicos se lleva a cabo a través de un proceso de transcripción discontinua del ARN (-) (Flint et al., 2015; Woo et al., 2023).

La replicación del genoma viral ocurre a través de la síntesis de moléculas intermediarias de ARN (-) de longitud completa, las cuales sirven como molde para la producción de nuevos ARN genómicos que serán encapsulados por la proteína N. El ensamblaje y la gemación de las ribonucleocápsides preformadas tienen lugar en las membranas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, específicamente en el compartimento intermediario retículo-Golgi (ER-Golgi, intermediate compartment ERGIC, por sus siglas en inglés), donde se insertan y se ensamblan las proteínas S, M y E. Finalmente, los viriones son liberados mediante exocitosis (Figura 5) (Flint et al., 2015; Sawicki, S. G., & Sawicki, D. L., 1995; Woo et al., 2023).

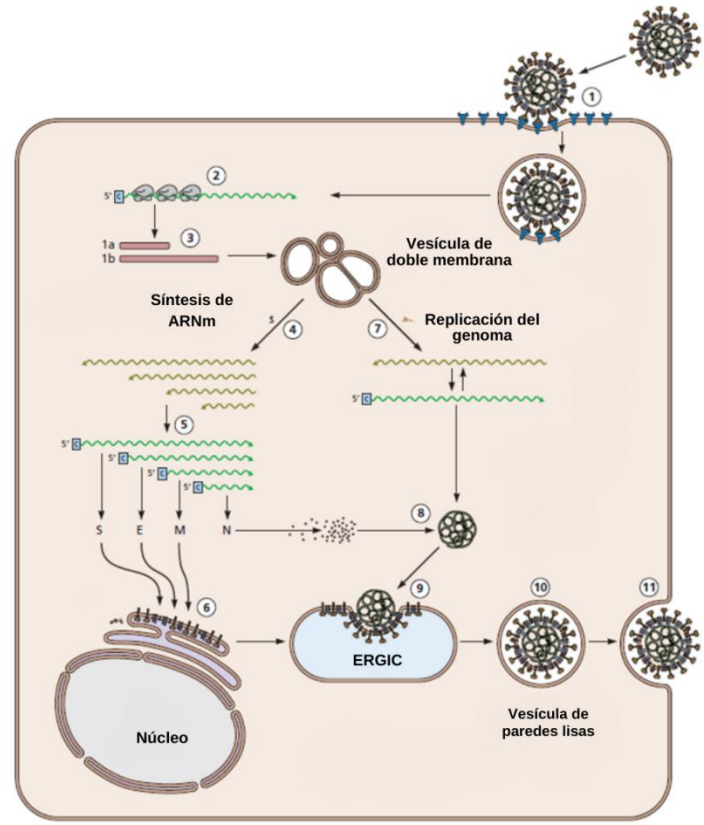


Figura 5. Ciclo replicativo de la familia *Coronaviridae*. Brevemente, se esquematiza el ciclo de infección del virus desde que se une a la membrana celular a través de la proteína S de superficie, ingresa a través de la fusión de membranas independiente de pH o por endocitosis, se libera la nucleocápside al citoplasma donde ocurre todo el proceso de replicación, y la traducción directa de las replicasas pp1a y pp1ab (1 a 3). Luego comienza la transcripción y traducción de los genes estructurales mediante la producción de ARNm a partir de la síntesis discontinua de ARN (-) subgenómicos (4 y 5). En paralelo, se sintetiza el ARN viral por la síntesis de intermediarios de longitud completa de ARN (-) las cuales sirven como molde para la producción de ARNmc (+) genómicos, los cuales son encapsidados por la proteína N (7 y 8). El ensamblaje y gemación se produce en el Retículo Endoplásmico y el Golgi (ERGIC) donde adquiere la membrana con las proteínas asociadas (6 y 9). Por último, la partícula de virus envuelta se transforma en una vesícula que se transporta a la membrana plasmática para su liberación por exocitosis (10 y 11). Modificado de Principles of Virology, 4th ed. Pág. 507 (Flint et al., 2015).

Subfamilia *Orthocoronavirinae*

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) esta subfamilia se clasifica en cuatro géneros en base a la caracterización genética y antigénica (Alfa-, Beta-, Gamma- y Deltacoronavirus) (Figura 6) los tres primeros corresponden a los antiguos grupos clasificados como 1, 2 y 3 (Poon et al., 2005; Woo et al., 2023).

- Los Alfacoronavirus forman un grupo monofilético dentro de la subfamilia y las características que los diferencian de los otros géneros son la presencia de un tipo único de nsp1 y de un gen accesorio comúnmente compartido (ORF3 en general) que codifica para una proteína de membrana. Dentro del género se encuentran algunos CoV humanos (HCoV-NL63, HCoV-229E), el CoV canino (CCoV), el CoV de murciélago *Rhinolophus* (HKU2) y el virus de la peritonitis infecciosa (FIPV), entre otros (Su et al., 2016; Woo et al., 2023).

- Los Betacoronavirus también son un grupo monofilético diferenciados por su gen nsp1. Presentan cuatro linajes separados (A – D) los cuales contienen un conjunto de genes accesorios únicos. Los virus del linaje A codifican adicionalmente para una hemaglutinina esterasa (HE) (funcionalmente similar a la proteína S). Como integrantes de este grupo se encuentran patógenos humanos como el HCoV-OC43, los SARS-CoV 1 y 2, MERS-CoV, el CoV de la hepatitis murina y el CoV de murciélago *Rousettus* (HKU9) (Su et al., 2016; Woo et al., 2023).

- Los Gammacoronavirus no presentan características conocidas en cuanto a morfología del virión, organización del genoma, composición de genes, replicación o propiedades biológicas que los diferencie de los otros géneros, a excepción de la estructura filogenética. Son principalmente CoV aviares como el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) (Poon et al., 2005; Woo et al., 2023).

- Por último, los Deltacoronavirus (DCoV) se identificaron inicialmente en varias especies de aves y mamíferos, especialmente en cerdos en China entre 2009 y 2011. El DCoV porcino se encuentra extendido por todo el mundo y está asociado con brotes de enfermedad diarreica en cerdos de granja. En cambio, el DCoV aviar se ha reportado en aves silvestres en diferentes países sin ninguna evidencia de enfermedad (Vlasova et al., 2021).

La mayoría de los CoV fueron aislados en humanos, mascotas, cerdos, ganado o aves de corral, debido a que las investigaciones han sido impulsadas principalmente por brotes de enfermedad en esas poblaciones. Sin embargo, las investigaciones sobre CoV en la vida silvestre son raras y se sabe poco sobre sus prevalencias (Poon et al., 2005).

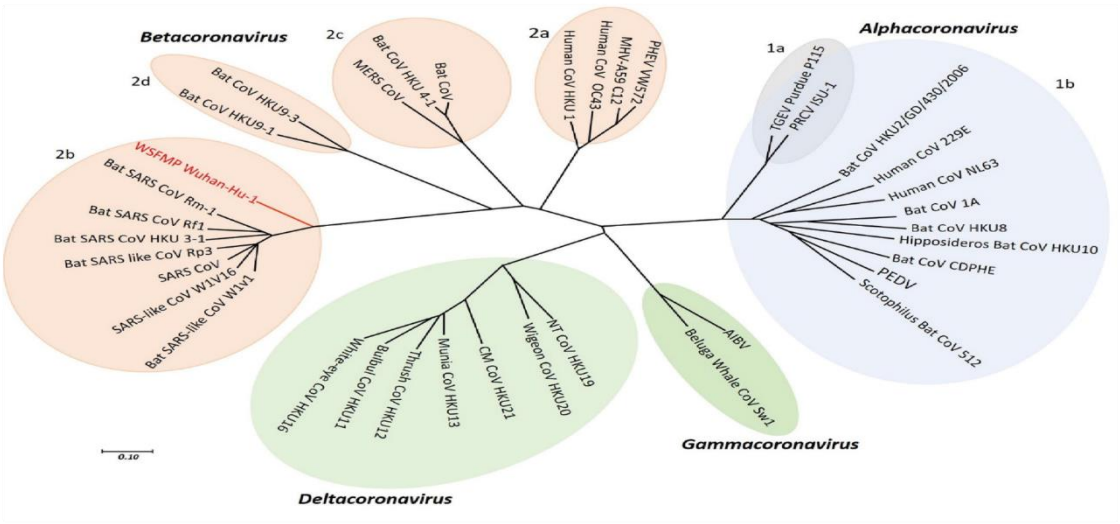


Figura 6. Relaciones filogenéticas de los *Orthocoronavirinae*. Se muestran algunos virus representativos de los cuatro géneros de la subfamilia: Alfacoronavirus (violeta), Betacoronavirus (naranja), Gammacoronavirus (verde oscuro) y Deltacoronavirus (verde claro). El árbol fue reconstruido con secuencias de la región codificante de la ARN polimerasa dependiente de ARN completa de los coronavirus representativos (modificado de Shereen et al., 2020).

Epidemiología y origen zoonótico de los coronavirus humanos

Las infecciones por CoV en animales domésticos se han reportado desde principios de la década de 1970 con diferentes tipos de patologías respiratorias y gastrointestinales. El primer CoV humano (B814) fue detectado en 1965 a partir de un aspirado nasal de un niño con síntomas de resfriado común (Tyrrell & Bynoe, 1965). Al momento, se conocen siete tipos de HCoV, de los cuales cuatro (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1) son causantes de resfriados comunes, excepto en niños, ancianos o pacientes inmunocomprometidos, en quienes pueden causar infecciones respiratorias más severas. Los otros tres, surgidos en los últimos 20 años: SARS-CoV-1, MERS-CoV y el actual SARS-CoV-2 han sido los agentes etiológicos detrás de enfermedades respiratorias graves y brotes epidémicos o pandémicos. Las vías de transmisión pueden ser por medio de objetos contaminados (fómites) o por vía aerogénica y/o fecal-oral (Lim et al., 2016; Woo et al., 2023).

Los estudios filogenéticos han proporcionado evidencia de que los CoV humanos HCoV NL63 y 229E se originaron a partir de CoV ancestrales presentes en murciélagos en África. En el caso específico del HCoV-NL63, se sugiere que podría haber surgido de un evento de recombinación entre CoV similares a NL63 y 229E que circulaban en murciélagos, y posteriormente, hace aproximadamente 563 a 822 años, se transmitió a los seres humanos a través de un contacto directo. En el caso de HCoV- 229E los camélidos son probablemente el hospedador intermediario

(Cui et al., 2019; Tao et al., 2017). Mientras que OC43 y HKU1 provienen de roedores y el hospedador intermediario es aún desconocido (Cui et al., 2019; Santos-López et al., 2021).

Con respecto al surgimiento del SARS-CoV-1 (síndrome respiratorio agudo severo), un beta-CoV del linaje B que apareció en la provincia de Guangdong, China en 2003, se ha identificado a las civetas de las palmas (*Paguma larvata*) como hospedador intermediario en los mercados de animales vivos. Según estudios realizados en civetas de granjas y otros animales en el mercado, los resultados indicaron que el SARS-CoV-1 no estaba presente en las civetas salvajes en Hong Kong, pero sí se había detectado en el contexto de las actividades comerciales que implicaban hacinamiento y mezcla de varias especies animales (Poon et al., 2005; Tu et al., 2004). Posteriormente, se identificaron anticuerpos contra el SARS-CoV-1 y un virus similar (SARSr-Rh-Bat-CoV) en los murciélagos de herradura (familia Rhinolophidae). En resumen, los hallazgos obtenidos junto con el análisis molecular del ORF8 de los CoV similares al SARS encontrados en murciélagos, respaldaron la hipótesis de que fue en estos murciélagos silvestres donde surgió el SARS-CoV-1 (Cui et al., 2019; Su et al., 2016).

El MERS-CoV (síndrome respiratorio del Oriente Medio) un BetaCoV del linaje C, surgió en Arabia Saudita en 2012 para luego expandirse a otros países de Medio Oriente, Europa, Asia, África y EE. UU con una letalidad aproximada del 35%. El virus fue identificado en los camellos en Medio Oriente y África, sin embargo, estos hallazgos solo sugirieron que los camellos podían infectarse naturalmente con MERS-CoV, pero no proporcionaron suficiente información sobre cómo se producía la transmisión. Actualmente, sabemos que los BetaCoV del linaje C incluyen otros dos miembros importantes, los CoV de murciélago (BatCoV) HKU4 y HKU5. A partir del estudio del uso del receptor CD26 humano y un dominio de unión al receptor RBD (receptor binding domain, por sus siglas en ingles) de la proteína S viral compartido y con especificidad similar entre HKU4 y el MERS-CoV, se ha propuesto como reservorio del MERS-CoV a los murciélagos (Cui et al., 2019; Samara & Abdoun, 2014; Su et al., 2016).

El SARS-CoV-2 causante de la enfermedad COVID-19 (*coronavirus disease 2019*, por sus siglas en inglés), fue registrado por primera vez en Wuhan, China, a fines de 2019. En menos de seis meses, su alta capacidad de transmisión lo convirtió en un virus pandémico presente en todo el mundo. La teoría más aceptada hasta el momento para explicar su origen es que se trata de un virus zoonótico que surgió a partir de un linaje de virus de murciélagos, conocido como BatCoV RaTG13 (con una identidad genética del 96%) (Zhou et al., 2020). No obstante, todavía se desconoce cuál podría haber sido la especie intermediaria en la propagación del virus desde los murciélagos (reservorios) a los humanos (hospedador susceptible), actuando como un eslabón intermedio en la cadena de transmisión. La hipótesis de que el pangolín malayo (*Manis javanica*) pudo haber sido ese animal intermediario, se basa en que la secuencia nucleotídica del dominio RBD de la proteína S no es similar entre el SARS-CoV-2 y Bat-CoV RaTG13, pero sí entre SARS-CoV-2 y el CoV de pangolín. Aunque se debe señalar que la identidad del genoma global es del 90%. Esto podría sugerir que existió un evento de recombinación entre los CoV de murciélagos y pangolines. En un contexto de comercio ilegal de esta última especie en China, y de mercados de animales silvestres en contacto estrecho con las personas, es posible que se haya facilitado la emergencia del SARS-CoV-2 (Pekar et al., 2022; Worobey et al., 2022; Zhou et al., 2020).

La recombinación es un mecanismo común en los CoV, lo que contribuye a la aparición de nuevas variantes. La alta frecuencia de estos eventos junto con la alta tasa de mutación del genoma ARN, da como resultado la generación de nuevos virus con una gran diversidad genética y cambios impredecibles en la virulencia durante las infecciones humanas (Su et al., 2016). Además, el dominio RBD de la proteína S es un determinante de la interacción virus-receptor, por lo tanto, también de la variedad y el tropismo celular del hospedador viral. Cambios en pocos residuos de RBD de la proteína S pueden conducir a una transmisión más eficiente entre diferentes especies (Bowen et al., 2022; Li et al., 2005).

Coronavirus reportados en murciélagos del Nuevo Mundo

Los murciélagos son reservorios de varios tipos de CoV, por lo que los esfuerzos de muestreo se han centrado cada vez más en ellos desde el descubrimiento de CoV similares al SARS en rinolófidos, sumado a que parecen ser reservorios de una gran cantidad de otros virus. Durante el brote de SARS-CoV-1 en China, Poon et al., (2005) no encontraron CoV en civetas en la naturaleza, pero sí un nuevo CoV de tipo 1 (actualmente clasificado como *alfacoronavirus*) en 3 especies de murciélagos *Miniopterus sp.* a partir de muestras fecales y de saliva (Anthony et al., 2013; Poon et al., 2005). Por esta razón, la mayoría de las investigaciones sobre virus en murciélagos se han centrado en China, seguidas por una vigilancia limitada en otros países del sudeste asiático, como Japón, Filipinas y Tailandia. En el Viejo Mundo se han reportado nuevos CoV, tanto en Europa como en África. En cambio, en el Nuevo Mundo en comparación, se sabe relativamente poco sobre la diversidad de CoV que se encuentran en la región. Por lo tanto, varios estudios en América se plantearon la búsqueda de genomas de CoV en murciélagos en diferentes áreas urbanas y rurales (Anthony et al., 2013). El primer estudio en el Nuevo Mundo que detectó AlfaCoV en murciélagos vespertiliónidos fue a través del análisis de muestras fecales recogidas en las Montañas Rocosas de EE.UU (Dominguez et al., 2007). Posteriormente, otros estudios en Canadá, EE. UU, México, Trinidad y Tobago, Brasil y, más recientemente en Argentina han identificado nuevos CoV de los géneros alfa y betacoronavirus (Carrington et al., 2008; Donaldson et al., 2010; Góes et al., 2013; Lima et al., 2013; Lucero Arteaga et al., 2023; Luis et al., 2013; Misra et al., 2009; Osborne et al., 2011; Simas et al., 2015).

Una revisión reciente de los estudios realizados sobre CoV en las Américas entre 2007 y 2020 encontró un total de 187 secuencias virales de CoV disponibles en GenBank, provenientes de 346 individuos de 43 especies de murciélagos de 10 países. Del total de especies, el 46,51% pertenecían a la familia Phyllostomidae, el 27,90% a Vespertilionidae, el 18,60% a Molossidae y el 6,97% a Mormoopidae. Se encontró una mayor prevalencia de AlfaCoV que BetaCoV, con mayor tropismo hacia el tracto intestinal, ya que se detectaron en mayor porcentaje en muestras de heces. Por lo tanto, las excreciones de murciélagos podrían considerarse como la principal fuente de transmisión de CoV (Hernández-Aguilar et al., 2021).

Los estudios indican que una sola especie o género de murciélago puede contener múltiples tipos de CoV, y que los CoV individuales están asociados con una sola especie o género de murciélago, incluso entre especies que comparten refugio. Además, los análisis filogenéticos muestran que los CoV se agrupan en función de la relación entre las especies hospedadoras, lo que

indica que estos virus evolucionan de manera diferente en función de la familia de murciélagos a la que pertenecen (Anthony et al., 2013).

En Uruguay circulan CoV bovinos y aviares como agentes de infecciones gastrointestinales y respiratorias (Bengochea et al., 2003; Marandino et al., 2019), pero se carece de información sobre CoV en murciélagos. Tres de las familias de murciélagos con mayor porcentaje de detección de CoV en América se encuentran en nuestro país, y en base a la falta de información se justifican más estudios de vigilancia de CoV.

Familia *Togaviridae*

Generalidades de la familia

La familia *Togaviridae* se compone de virus pequeños envueltos de ARNmc +, siendo el género Alfavirus el único en esta familia con 32 especies (Chen at al., 2019; Flint et al., 2015). Estos virus son transmitidos principalmente por artrópodos, como mosquitos, aunque otros insectos hematófagos como garrapatas, piojos y chinches también se han visto involucrados en su transmisión. Los alfavirus tienen una distribución mundial y pueden ser patógenos en sus hospedadores vertebrados, siendo muchos de ellos de gran importancia para la salud humana y veterinaria. Estos virus pueden infectar una amplia gama de hospedadores, incluyendo humanos, primates, équidos, aves, anfibios, reptiles, roedores, cerdos, mamíferos marinos y salmónidos. Los alfavirus pueden depender de una o pocas especies de mosquitos como vectores principales, pero tienen la capacidad de utilizar varios vertebrados diferentes como hospedadores enzoóticos de manera simultánea. Esta amplia gama de hospedadores potenciales facilita la transmisión y propagación del virus en la naturaleza. Sin embargo, esta interacción específica virus-vector puede limitar su distribución geográfica. Ejemplos de la emergencia y reemergencia de estos virus son los virus Chikungunya (CHIKV), encefalitis equina del este (EEEV), Mayaro (MAYV) y el virus Madariaga (MADV) en América Central y del Sur (Chen et al., 2018; Brunini et al., 2017; Burgueño et al., 2018; Lwande et al., 2013; Nunes et al., 2015; Powers et al., 2001; Stechina et al., 2019; Weaver et al., 2012).

La estructura taxonómica de los alfavirus se ha organizado en una combinación de complejos antigénicos y genéticos a partir de estudios serológicos y secuencias genómicas (Weaver et al., 2012). En el árbol filogenético de los alfavirus (Figura 7) pueden observarse tres clados principales: el primero diverge en los complejos de la encefalitis equina venezolana (VEE) y encefalitis equina del este (EEE); el segundo clado se bifurca en el virus de Trocara, el complejo del virus de Eilat y el complejo de la encefalitis equina occidental (WEE); por último, el tercero contiene el virus del bosque de Barmah, el virus de la enfermedad del páncreas del salmón, el virus del elefante marino del sur, el virus Ndumu, el virus de Middleburg y el complejo del virus del bosque de Semliki (Chen et al., 2018).

Además, los alfavirus también pueden ser separados en función de las enfermedades que causan. Los alfavirus del Viejo Mundo, como los virus Ross River, bosque de Barmah, MAYV, O'nyong-nyong (ONNV), CHIKV y Sindbis, causan síndrome de artralgia, mientras que los alfavirus del Nuevo Mundo, como EEEV, VEEV y WEEV, causan encefalitis. Es interesante destacar que algunos alfavirus que causan signos y síntomas clínicos idénticos se mantienen en condiciones ecológicas diferentes y tienen una distribución geográfica distinta. Por ejemplo, el virus MAYV está limitado geográficamente a América Latina, mientras que ONNV se encuentra en África. Estos patrones epidemiológicos plantean preguntas sobre las relaciones evolutivas, origen y expansión geográfica de los alfavirus, como se ha destacado en estudios anteriores (Burgueño et al., 2018; Powers et al., 2001).

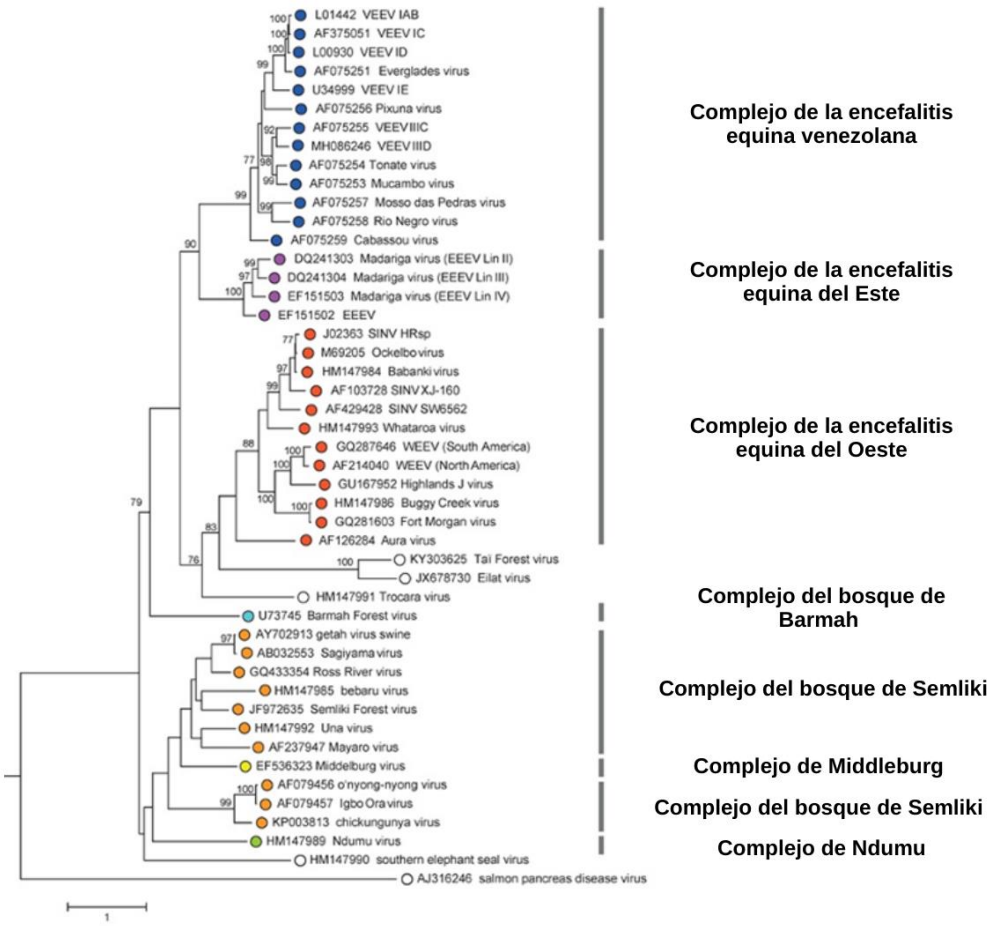


Figura 7. Árbol filogenético de la familia *Togaviridae.* Se utilizaron secuencias representativas de todas las especies de alfavirus, generadas a partir de una región conservada del gen de la proteína de envoltura (2184 pb) (Modificado de Chen et al., 2018).

Alfavirus de importancia en la región, sus ciclos enzoóticos y epizoóticos

En la naturaleza los alfavirus se mantienen en ciclos enzoóticos (donde el virus circula continuamente entre los mosquitos y los hospedadores vertebrados susceptibles como amplificadores) y epizoóticos (que involucra a hospedadores incidentales, por ejemplo, caballos, y brotes epidémicos en humanos) (Go et al., 2014). Los mosquitos hembra adquieren el virus al alimentarse de la sangre de un animal infectado y lo transfiere a través de la saliva al nuevo hospedador (Weaver & Barrett, 2004). En estos ciclos los vectores y/o hospedadores amplificadores involucrados pueden variar, y las cepas virales enzoóticas pueden, mediante mutación y posterior adaptación, volverse epizoóticas (por ejemplo, VEEV) (Burgueño et al., 2018). En los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos), la exposición humana puede producirse por un desbordamiento de ciclos enzoóticos por contacto de los humanos con los focos zoonóticos, y/o cuando la amplificación enzoótica aumenta la circulación cerca de los humanos (por ejemplo, en los virus EEEV y WEEV). En estos casos los humanos y otros animales son hospedadores finales y las infecciones pueden ser

asintomáticas o provocar enfermedad de gravedad variable (desde un síndrome febril hasta una encefalitis) (Figura 8) (Burgueño et al., 2018; Weaver et al., 2005, 2012).

La transmisión puede darse directamente por los vectores primarios (por ejemplo, WEEV), y/o por vectores secundarios con mayor preferencia de alimentación que incluyan humanos (por ejemplo, EEEV). La mayoría de los alfavirus que son transmitidos por mosquitos pueden usar mamíferos pequeños o aves como reservorios para su mantenimiento en la naturaleza a largo plazo. El rango o distribución de la transmisión, en condiciones normales, va a estar dado por la presencia del reservorio y del vector (Burgueño et al., 2018; Weaver, 2005). Además de la variabilidad genética intrínseca de los alfavirus y su adaptabilidad, la alteración del hábitat por actividades humanas y el cambio climático son factores que pueden alterar su nicho ecológico provocando eventos de emergencia o reemergencia viral como se evidencia en los recientes brotes por CHIKV y MAYV en América Central y del Sur, y de MADV en América Central (Moreira Marrero et al., 2021).

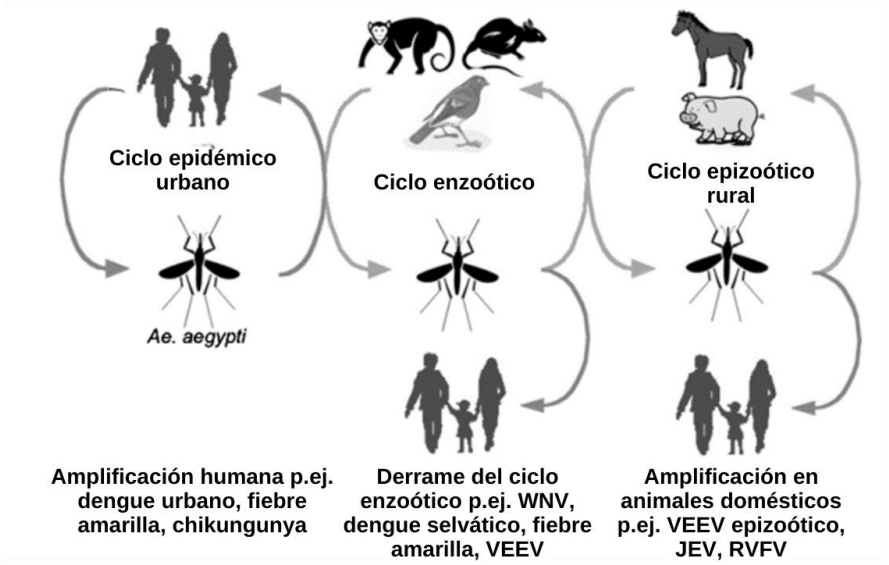


Figura 8. Mecanismos de infección humana por arbovirus zoonóticos. En el centro se muestra un ciclo enzoótico típico de amplificación en primates, roedores o aves como hospedadores reservorios/amplificadores y mosquitos como vectores. El contagio a las personas puede suceder por el acercamiento a los hábitats donde ocurren estos ciclos y/o cuando la amplificación da como resultado altos niveles de viremia y circulación. El vector puede ser el mismo involucrado en el ciclo enzoótico u otro con mayor preferencia alimenticia hacia los humanos. A la derecha se muestra un ciclo de amplificación secundaria en animales domésticos (por ejemplo, equinos) lo que aumenta el contacto con los humanos y la probabilidad de infección (VEEV en este ciclo necesita cambios mutacionales que potencien la viremia en los equinos). Por último, a la izquierda un escenario de un ciclo epidémico urbano donde se utilizan a los humanos como amplificadores y reservorios (por ejemplo, el virus Chikungunya) (modificado de Weaver, 2005).

Aquí se presentan algunas de las características, vectores, hospedadores y epidemiología de los alfavirus pertenecientes a los complejos EEE, WEE y VEE, que son algunos de los más relevantes para la salud humana y animal en América del Sur (Weaver et al., 2012).

- Complejo VEE (del inglés, *venezuelan equine encephalitis*)

El complejo VEE comprende un grupo de alfavirus ampliamente distribuidos en las Américas, incluyendo los virus VEEV, Mosso das Pedras (MDPV), Cabassou (CBV), Everglades (EVEV), Mucambo (MUCV), Pixuna (PIXV) y Rio Negro (RNV), con al menos 14 subtipos y variedades (Aguilar et al., 2011; Burgueño et al., 2012; Deardorff et al., 2009). Se dividen en dos grupos epidemiológicos: cepas epidémicas o epizoóticas (VEEV, subtipos AB y C) asociadas con enfermedades en caballos y grandes epidemias humanas, y cepas enzoóticas que se mantienen entre mosquitos *Culex* y roedores silvestres (Pisano et al., 2014). Las cepas epizoóticas se transmiten por mosquitos de los géneros *Psorophora sp. y Aedes sp*., causando brotes graves en caballos y enfermedades neurológicas en humanos. Durante estos brotes, hay una amplificación secundaria del virus en caballos, lo que aumenta la propagación hacia las personas en áreas rurales. Esto puede estar relacionado con mutaciones adaptativas en cepas enzoóticas (Aguilar et al., 2011; Burgueño et al., 2018; Carrera et al., 2014; Deardorff et al., 2009; Go et al., 2014; Weaver, 2005).

Se han reportado brotes de VEE en humanos y caballos en varios países de América, incluyendo Venezuela, Colombia, Perú, Ecuador, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, El Salvador, Guatemala, Panamá, México y EE. UU (Aguilar et al., 2011). En el norte de Argentina se han detectado VEEV enzoóticos desde 1980, incluyendo RNV, que se ha encontrado en mosquitos, en roedores y también asociados a enfermedades febriles agudas en humanos (Cámara et al., 2003; Contigiani et al., 1993, 1999; Mitchell et al., 1985). Además, se ha detectado mediante serología la circulación de anticuerpos en personas de provincias del norte de Argentina de los virus VEEV subtipos AB, D, virus MDPV, RNV y PIXV (Pisano et al., 2010, 2012, 2013). En Brasil, se ha registrado la circulación de los virus MDPV, MUCV y PIXV en la zona amazónica y sureste, los cuales están muy extendidos en el territorio. La exposición a los mosquitos vectores de arbovirus está relacionada con el ingreso a los bosques, y algunas áreas forman parte de rutas migratorias de aves silvestres, que pueden ser reservorios naturales de virus causantes de encefalitis (Romano-Lieber & Iversson, 2000; Silva & Angerami, 2008; Vasconcelos et al., 1991; Zoraida et al., 2000). En Bolivia, se realizó recientemente la identificación de un RNV a través de análisis genómicos. Este descubrimiento se originó a partir de un caso clínico humano que presentaba síntomas de una enfermedad febril inespecífica en la región de Tarija, que limita con Argentina (Loayza Mafayle et al., 2023).

- Complejo EEE (del inglés, *eastern equine encephalitis*)

El complejo antigénico EEE se divide en cuatro linajes en América del Norte, Central y del Sur, con diferencias en variabilidad antigénica, genética, patrones filogenéticos y evolutivos, epidemiología, patogenicidad humana y distribución geográfica (Arrigo, Paige Adams, et al., 2010). El linaje I (antes conocido como el EEEV norteamericano, NA EEEV) es endémico en América del Norte y el Caribe, siendo responsable de la mayoría de los casos en humanos, con una tasa de mortalidad del 30% en casos de enfermedad neuroinvasiva (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC], 2021). Los linajes II, III y IV, ahora denominados virus MADV (anteriormente EEEV sudamericano, SA EEEV), afectan principalmente a caballos en América Central y del Sur, con raras infecciones humanas registradas (Gil et al., 2021; Go et al., 2014).

En América del Norte, la transmisión del EEEV se da entre aves y mosquitos *Culiseta melanura*, que no son vectores significativos para los humanos. Sin embargo, otros mosquitos actúan como puentes entre aves infectadas y mamíferos susceptibles, como equinos y humanos (CDC, 2021). Además, se ha encontrado evidencias de su circulación en mosquitos y murciélagos de América del Sur (Burgueño et al., 2018; Hoyos-López et al., 2016; Moreira Marrero et al., 2022). En América Central y del Sur, el ciclo de transmisión de MADV no está completamente definido, pero se cree que los mosquitos del género *Culex* son los principales vectores enzoóticos (y potencialmente epizoótico), y que el ciclo enzoótico se mantiene principalmente entre las aves y pequeños vertebrados (Arrigo, Paige Adams, et al., 2010; Burgueño et al., 2018; Go et al., 2014; Monath et al., 1985; Stechina et al., 2019).

Los virus del complejo EEE tienen el potencial de causar enfermedad en humanos, este riesgo podría verse incrementado por cambios ecológicos con un incremento en el contacto humano con los ciclos de transmisión enzoótica, cambios genéticos en las cepas o un rango alterado de hospedadores (Carrera et al., 2013).

- Complejo WEE (del inglés, w*estern equine encephalitis*)

El complejo WEE está compuesto por varios virus, incluyendo el virus Highland J, Fort Morgan y Buggy Creek en América del Norte, el virus WEE en América del Sur y Norte, el virus Aura en América del Sur y el virus Sindbis con cuatro subtipos en África, Asia, Australia y Europa (Go et al., 2014; Powers et al., 2001). El virus WEEV Fue identificado por primera vez en América del Norte en 1930 y se encuentra desde América del Norte hasta América del Sur, incluidos Guyana, Ecuador, Brasil, Uruguay y Argentina (Go et al., 2014).

En caballos, el WEEV es menos grave que el EEEV, con tasas de letalidad de alrededor del 20% al 30% en brotes epidémicos, pero puede llegar al 50%. En humanos, la mayoría de los casos son asintomáticos, pero los bebés y niños susceptibles tienen un mayor riesgo de desarrollar encefalitis grave (Go et al., 2014).

El WEEV se encuentra principalmente en entornos agrícolas con sistemas de irrigación, donde el mosquito *Culex tarsalis* puede reproducirse y transmitir el virus entre aves. La transmisión a humanos y caballos puede ocurrir a través de un contacto directo con el mosquito infectado con sangre aviar virémica. También se ha identificado un ciclo secundario de amplificación viral entre lagomorfos y otras especies de mosquitos, pero no se cree que ocurra amplificación en humanos y caballos debido a que desarrollan poca viremia después de la infección por WEEV (Weaver, 2005).

Características del virión y del genoma

Los viriones esféricos de 65 a 70 nm, contienen una nucleocápside icosaédrica (T= 4) y una envoltura lipídica con ochenta espículas de glicoproteína trimérica que cubren la superficie. Cada espícula está compuesta por tres heterodímeros de las proteínas E1-E2, en algunos alfavirus, la glicoproteína E3 permanece asociada de forma no covalente a estas espículas. E1 y E2 contienen cada una un único dominio transmembrana (E1 con una porción interna corta, y E2 un dominio largo que interactúa con la proteína de la cápside), estas son las proteínas mínimas requeridas para que se genere un virión infeccioso (Figura 9A). La envoltura de membrana lipídica la obtienen durante la

gemación del virus desde la célula del hospedador, brotando en regiones ricas en colesterol y esfingomielina (en las células de vertebrados). El genoma ARNmc + de 10 a 12kb de longitud es infeccioso y sirve tanto como ARN genómico como para ARN mensajeros subgenómicos. En sus extremos presenta un extremo 5´-cap y una región 3' no codificante con cola poli(A) que codifican cinco proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K y E1) para el ensamblaje del virus, y cuatro no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 Y nsP4) implicadas en la replicación del genoma viral (Figura 9B) (Chen et al., 2018; Flint et al., 2015).

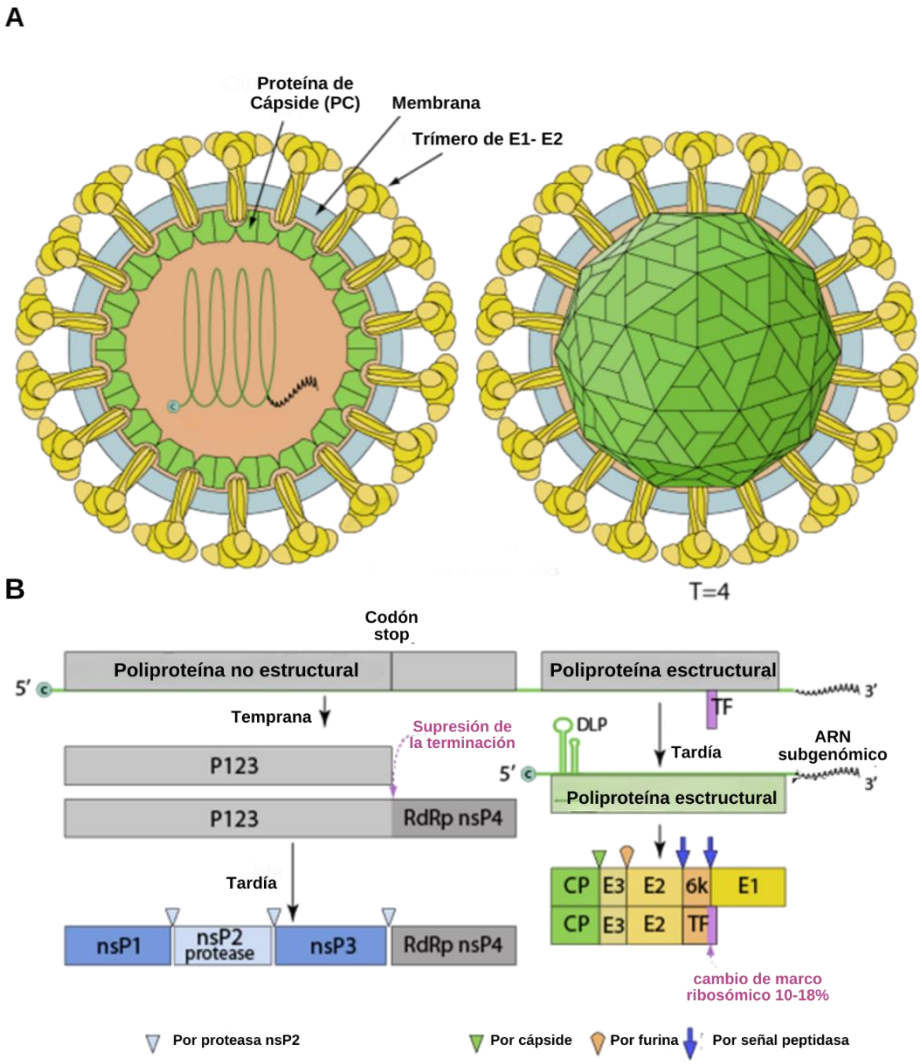


Figura 9. Esquema general de la estructura del virión y del genoma de los alfavirus (*Togaviridae*). (A) Esquema del virión. Se muestra la nucleocápside icosaédrica (T=4 de 240 monómeros) rodeada por la envoltura plasmática que contiene 80 espículas de proteínas asociadas (cada uno conformado por un trímero de proteínas E1/E2). **(B) Organización del genoma.** Esquema del genoma monocatenario de ARN (+) simple hebra de 10 a 12kb de un alfavirus. Los primeros dos tercios del genoma contienen una estructura 5'-cap, y es traducido directamente en las poliproteínas no estructural P123 y P1234 (precursora de la ARN polimerasa viral, RdRp nsP4). La poliproteína estructural ubicada en el extremo 3' del genoma se expresa a través de un ARNm subgenómico que es copiado de un intermedio de ARN (-) de cadena completa (Flint et al., 2015). Modificado de ViralZone (https://viralzone.expasy.org/3).

Ciclo replicativo

Las proteínas E1 y E2 forman espículas que permiten la entrada del virus en la célula mediante endocitosis. Primero, E2 se une al receptor, y luego por acidificación del endosoma se fusionan las membranas viral y endosomal gracias a la proteína E1, para liberar el ARN viral en el citoplasma. Las cuatro proteínas no estructurales (nsP1–4) necesarias para la síntesis de ARN son inicialmente traducidas a partir de una poliproteína P1234, la cual es escindida por la actividad proteasa de la proteína nsP2 para formar la proteína precursora P123 y nsP4 (nsP4 es la polimerasa de ARN dependiente de ARN). El complejo de replicación temprana, conformado por P123 y nsP4, es responsable de sintetizar hebras negativas de ARN. El complejo de replicación tardío compuesto por nsP1–nsP4 (P123 completamente procesada), es el encargado de producir hebras positivas genómicas y subgenómicas. La replicación tiene lugar en fábricas virales citoplasmáticas formadas en la superficie de la membrana plasmática de los endosomas, que posteriormente se trasladan al interior de la célula (Figura 10) (Chen et al., 2018; Flint et al., 2015; Pietilä, M. K. et al., 2017).

Las poliproteínas estructurales, tales como CP/E3/E2/6K/E1 (en su mayoría) o CP/E3/E2/TF (a través de un evento de desplazamiento de marco de traducción (-1)), son traducidas por ribosomas citoplasmáticos libres a partir de ARNm subgenómicos. Después de la escisión autoproteolítica de la proteína de la cápside (CP), se libera una secuencia hidrofóbica que dirige a los ribosomas hacia el retículo endoplasmático (RE). La poliproteína restante PE2-6K-E1 es transportada por la vía secretora, donde las glicoproteínas se insertan en la superficie externa de la membrana citoplasmática a través del RE, el Golgi y finalmente la membrana citoplasmática. Simultáneamente, el ARN genómico se asocia con la proteína de la cápside (nucleocápside), que migra hacia la membrana citoplasmática para unirse a las glicoproteínas virales. Finalmente, el virión adquiere la envoltura al brotar por gemación (Figura 10) (Chen et al., 2018; Flint et al., 2015).

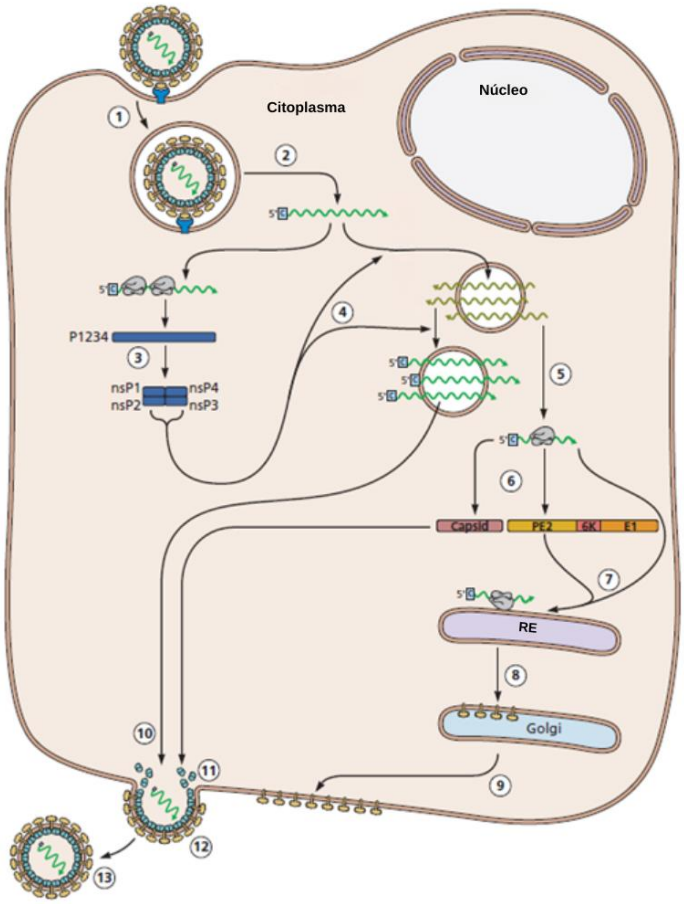


Figura 10. **Ciclo replicativo de la familia *Togaviridae*.** Brevemente, se esquematiza el ciclo de infección del virión el cual se une al receptor celular e ingresa vía endocitosis. Luego de la acidificación del endosoma se libera la nucleocápside en el citoplasma con posterior liberación del genoma (1 a 2). El ARN viral sirve directamente para su traducción y formación de la poliproteína no estructural P1234. Por escisión secuencial de esta poliproteína en diferentes sitios por una proteinasa viral se produce ARN polimerasas con diferentes especificidades (3 a 4). La síntesis de ARN viral tiene lugar en estructuras membranosas donde las enzimas virales copian secuencialmente cadenas de ARN (+) en cadenas completas (-) y (+) y catalizan la síntesis de ARNm subgenómico (5). Los ARNm son traducidos por ribosomas citoplasmáticos libres para producir la poliproteína estructural. Por escisión proteolítica se produce la proteína de la cápside lo que induce a los ribosomas a asociarse al RE (6 a 7). En consecuencia, la poliproteína PE2-6K-E1 (glicoproteínas) ingresa a la vía secretora del Golgi y son transportadas a la superficie celular (8 a 9). Por otro lado, se ensambla la nucleocápside junto con el ARNmc (+) genómico y migran a la membrana plasmática para asociarse con las glicoproteínas virales (10 a 11). Por último, el virión es liberado por gemación donde adquiere la envoltura viral (12 a 13). Modificado de Principles of Virology, 4th ed. Pág. 535 (Flint et al., 2015).

Rol de los murciélagos

Varios estudios han reportado evidencias de infección por alfavirus en murciélagos, sin embargo, se desconoce el rol de estos mamíferos en los ciclos naturales (Calisher et al., 2006; Go et al., 2014). Se han detectado por serología, y en menor medida por detección genómica, los virus EEEV, VEEV y WEEV en diferentes especies de murciélagos de América, incluidos Brasil, Trinidad y

Tobago, Guatemala y México (Calisher et al., 1982; Correa-Giron et al., 1972; Guzmán-Terán et al., 2020; Price et al., 1978a,b; Scherer et al., 1971; Thompson et al., 2015; Ubico & Mc Lean et al., 1995).

Es necesario ampliar el estudio de vectores, hospedadores y arbovirus como los alfavirus que son simpátricos entre ellos y a los humanos, para entender la dinámica de estos virus en sistemas de circulación complejos donde se producen continuamente brotes zoonóticos emergentes y reemergentes (Sotomayor-Bonilla et al., 2017). En este sentido, los murciélagos podrían tener un papel potencial como hospedadores dispersores o en el mantenimiento de estos virus en la naturaleza (Calisher et al., 2006; Go et al., 2014; Guzmán-Terán et al., 2020).

Alfavirus en Uruguay

En Uruguay se ha detectado la circulación de alfavirus desde 1970 cuando se encontraron anticuerpos contra WEEV en muestras de suero de niños (Somma et al., 1970). Entre los años 1972 - 1973 se reportaron epizootias y un aislamiento de WEEV en caballos de Argentina y Uruguay, y en 2009 se reportó un caso fatal en un niño por este virus (Delfraro et al., 2011).

Burgueño et al., detectaron el genoma viral de RNV (complejo VEEV) y EEEV linaje I en mosquitos *Culex pipiens* en Fray Bentos (Río Negro) y Las Toscas (Canelones) respectivamente, capturados entre los años 2006 y 2014. Cabe destacar que el linaje I de EEEV circula en ciclos enzoóticos en la costa este de Norteamérica, Caribe y Centroamérica, por lo que es posible que ocurriera una circulación silenciosa o una introducción esporádica de este linaje viral (Arrigo, Adams, et al., 2010; Burgueño et al., 2018).

Además, se detectaron en equinos anticuerpos para todos los virus probados (RNV, VEEV subtipo IAB, PIXV, MADV y WEEV), siendo el RNV el de mayor prevalencia con porcentajes que oscilan entre el 4% y el 20%, en 10 de los 18 departamentos muestreados. Estos resultados junto con las detecciones en mosquitos, surgieren que varios alfavirus pueden estar circulando en ciclos enzoóticos en Uruguay, con eventos epizoóticos esporádicos que involucran mosquitos y vertebrados (Burgueño et al., 2018). Hasta mayo del 2023, se notificaron un total de 68 casos humanos de CHIKV, de los cuales 47 fueron casos autóctonos y 21 importados, marcando la primera vez que se ha registrado circulación autóctona del virus en nuestro país (Intendencia de Montevideo, 2023; Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2023).

Con respecto al estudio de alfavirus en murciélagos, nuestro grupo reportó la detección e identificación genómica de RNV en dos especies autóctonas: *T. brasiliensis* (n= 6) y *Myotis spp.* (n= 1), y EEEV en *Myotis spp*. (n= 2) a partir de hisopados orales de murciélagos capturados en el norte de Uruguay. Estos resultados mostraron que los murciélagos de nuestro país pueden infectarse por estos arbovirus y además podrían participar en el ciclo natural viral como amplificadores o como hospedadores finales (“dead end hosts”) (Moreira Marrero et al., 2022).

2. Objetivos

Objetivo general

Identificar y caracterizar virus con potencial zoonótico o emergente como los coronavirus y profundizar en la caracterización de alfavirus, explorando el rol de los murciélagos como posibles participantes en el ciclo natural de los mismos.

Objetivos específicos

1. Colectar muestras de hisopados orales y anales, y sangre a partir de murciélagos autóctonos capturados en diferentes localidades de Uruguay.
2. Detectar y caracterizar coronavirus por RT-PCR anidada dirigida contra una región conservada del gen de la polimerasa viral (RdRp) en muestras de archivo y muestras obtenidas en el objetivo 1.
3. Profundizar en el estudio de detección y caracterización de alfavirus por RT-PCR anidada genérica dirigida a una región del gen nsp4 en muestras de archivo y muestras obtenidas en el objetivo 1.
4. Detectar y caracterizar la presencia de alfavirus mediante RT-PCR anidada genérica dirigida a una región del gen nsP4 en muestras de mosquitos capturados en las inmediaciones de las colonias de murciélagos.
5. Puesta a punto de protocolos de titulación de virus Río Negro para la búsqueda de anticuerpos neutralizantes en murciélagos.

3. Materiales y Métodos

3.1 Colecta de muestras de murciélagos

3.1.1 *Captura de los murciélagos*

Las capturas se realizaron utilizando redes de niebla o trampas arpa en la entrada de los refugios identificados o en zonas de posible pasaje de los animales en vuelo. Cuando fue posible se utilizó calderín de mano o captura manual. Los murciélagos fueron colocados en bolsas individuales de tela suave (que permite la reducción de estrés por aislamiento lumínico del espacio exterior) mantenidas en una zona de bajo ruido y temperatura cálida para limitar la pérdida de calor corporal hasta la toma de datos y muestras (Mello, 2019).

Se registraron los siguientes datos morfológicos: identidad taxonómica, de acuerdo a González & Martínez-Lanfranco (2010), sexo (genitalia externa), condición reproductiva (posición de los testículos, apertura de la vagina y desarrollo de las glándulas mamarias), clase de edad (adulto o juvenil) y largo del antebrazo. Antes de ser liberados, se les colocó a todos los individuos una banda alar con número identificatorio.

3.1.2 *Toma de muestras*

Se tomaron 329 muestras procedentes de hisopados orales y anales de murciélagos autóctonos de diferentes localidades de Uruguay capturados entre los años 2017 y 2022. De estas muestras, 257 fueron colectadas en el período 2017-2019 (*muestras de archivo*) y 72 fueron colectadas en 2022 (*muestras nuevas*).

- *Muestras de archivo*

Las muestras de murciélagos insectívoros fueron colectadas entre 2018 y 2019 por el Dr. Germán Botto e integrantes del Programa para la Conservación de los Murciélagos de Uruguay (PCMU), dentro de los siguientes proyectos: *Estudios genéticos, acústicos y de trayectorias de murciélagos en Uruguay: impacto de las turbinas de viento en su comportamiento y conservación* (responsables: Alexandre Hassanin & Germán Botto. Programa ECOS-Sud Uruguay); *Conservación de murciélagos cavernícolas en Uruguay* (Estudiante referente: Mariana Díaz Ruiz. Tutores: Raúl Maneyro & Germán Botto. PAIE – CSIC – UdelaR[1]). Las muestras de *D. rotundus* fueron tomadas entre 2017 y 2019 asociadas al proyecto: *Effect of landscape fragmentation in bat population dynamics and disease persistence in Uruguay* (responsable: Germán Botto)[2], de los cuales actué como colaboradora junto con otros integrantes del PCMU (Figura 11).

[1] Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil - Comisión Sectorial de Investigación Científica – Universidad de la República.

[2] Latin American Student Field Research Award – American Society of Mammalogists / Student research scholarships for global bat conservation priorities – Bat Conservation International.

- *Muestras nuevas*

Las muestras nuevas fueron colectadas en el marco de los proyectos: *Caracterización de virus en murciélagos del Uruguay. Implicancias para la conservación de la biodiversidad e impacto en la salud humana y animal* (responsables: Dra. Adriana Delfraro y Dra. Sandra Frabasile. Financiación: Fondo Clemente Estable - Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay), *Estacionalidad reproductiva en murciélagos insectívoros de Uruguay* (responsable: Micaela Álvarez. Tutor: Germán Botto (proyectos estudiantiles: Financiación: PAIE – CSIC – UdelaR); y *Entre ruinas y murciélagos: conservación de Biodiversidad y Uso del patrimonio histórico* (Estudiante responsable: Juan Manuel Díaz. Orientador: Germán Botto, financiado en la convocatoria 2021 a Proyectos Estudiantiles de Extensión – SECEAM, UdelaR), de los cuales fui participante o actué como colaboradora junto con otros integrantes del PCMU (Figura 11).

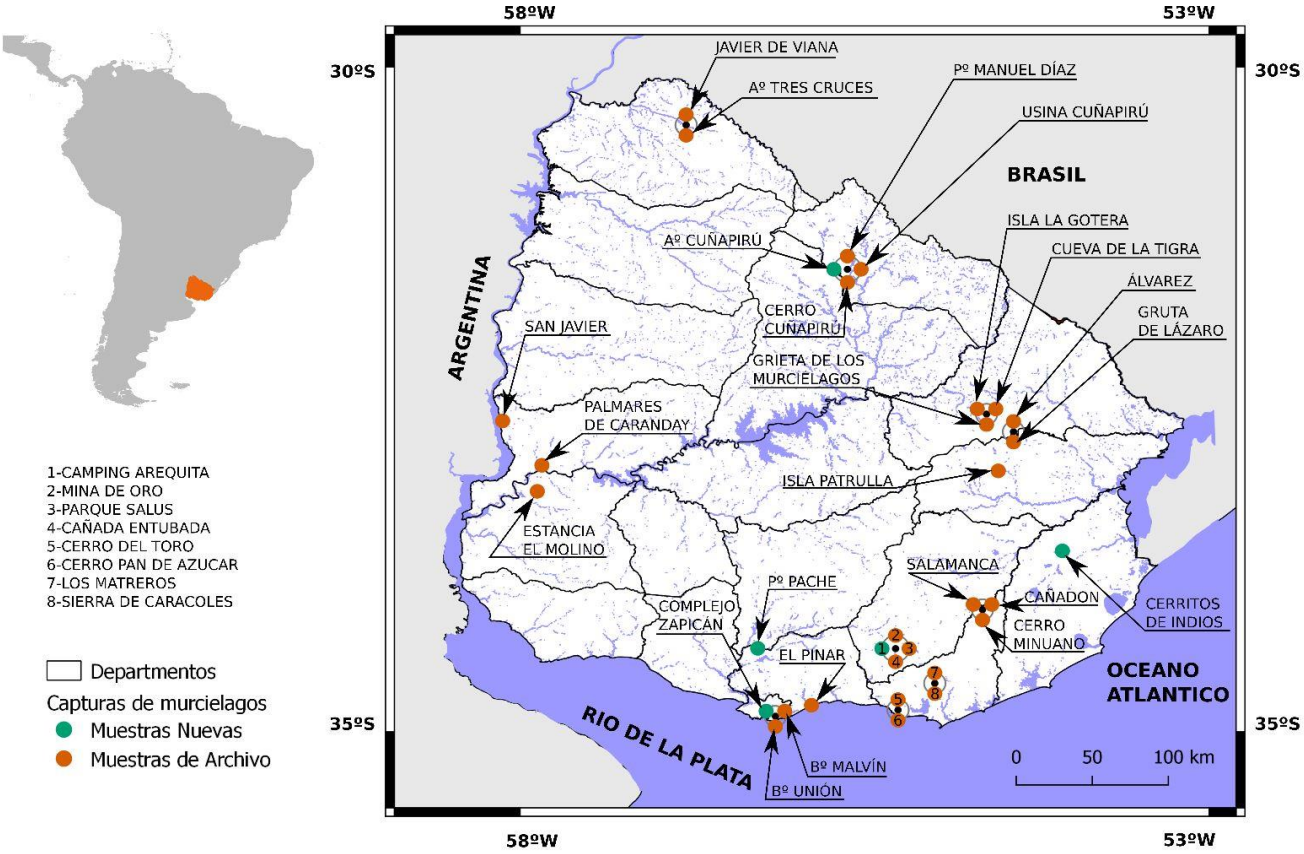


Figura 11. Distribución geográfica de las capturas de murciélagos en Uruguay. Las localidades de muestreo se representan en verde para las muestras nuevas y en naranja para las muestras de archivo. En los departamentos de Lavalleja y Maldonado, donde se llevaron a cabo múltiples capturas en localidades cercanas, se identifican mediante números de referencia del 1 al 8 (lista a la izquierda).

3.1.3 *Conservación de la muestra*

Las muestras de hisopados orales y anales se tomaron con hisopos de algodón estéril y se colocaron en criotubos con 400µL de buffer de transporte viral (DNA/RNA Shield™, Zymo Research). Adicionalmente, para estudios serológicos de alfavirus en murciélagos de la colonia de la Usina Cuñapirú (Rivera) se les tomaron muestras de sangre realizando una punción en la vena alar con aguja estéril y utilizando un capilar heparinizado, almacenado en 500µL de PBS estéril en una dilución 1:10. El transporte al laboratorio fue a temperatura ambiente o a -20°C cuando fue posible (freezer de campo del PCMU). Luego, permanecieron almacenadas a -80°C la Sección Virología hasta su procesamiento.

3.1.4 *Extracción de material genómico*

Los ácidos nucleicos virales totales de todas las muestras nuevas y de archivo de hisopados orales/anales se extrajeron utilizando un kit comercial Quick DNA/RNA Miniprep (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A excepción de las muestras de archivo de *D. rotundus* que ya habían sido previamente extraídas por el Dr. Germán Botto para el análisis de herpesvirus en el marco de su proyecto de doctorado, utilizando el mismo kit de extracción (Botto Nuñez, 2021).

3.1.5 *Retrotranscripción (RT)*

Todos los extractos obtenidos de ADN/ARN totales fueron retrotranscriptos utilizando *random primers* a fin de servir como ADNc para ensayos de amplificación de diferentes familias virales de genoma ARN.

Brevemente, se realizó una primera mezcla de reacción con 7µL de H_2O ultrapura, 1µL de *random primers* (60µM), 1µL de dNTPs (10mM) y 5µL de extracto de ARN en un volumen final de 14µL. Se realiza un primer ciclado de 65°C 5 min y 4°C 5 min. Luego, se adicionaron 6µL de la segunda mezcla de reacción con 4µL de 5X First-strand Buffer, 1µL de DTT (100mM) y 1µL de SuperScript ™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen ™) en un volumen final de 20µL. Se finaliza con un ciclado de 25°C por 10 min, 42°C por 60 min y 70°C por 15 min.

3.2. Ensayos para detección de coronavirus

Todas las muestras de *archivo* y *nuevas* fueron analizadas para la detección de CoV. Para esto, se pusieron a punto cuatro protocolos de RT-PCR convencional de panCoV dirigidos a una región conservada de la polimerasa viral (RdRp) con el fin de encontrar el más adecuado para la identificación de CoV de murciélagos en nuestro país. En todos los ensayos se utilizó un extracto de

ARN del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) como control positivo (cedido por la Dra. Natalia Ramos de la Sección Virología, Facultad de Ciencias, UdelaR).

3.2.1 *Primer protocolo (Chu et al., 2011)*

Se realizó una PCR anidada convencional donde se adicionó 2µL de ADNc a la mezcla de reacción con 5µL de Buffer de PCR 10X, 2.5µL de MgCl2 (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 1µL de los cebadores Pau_1F y Pau_1R (100µM), 0.25µL de Taq Platinum® (Invitrogen™) y 37.25µL de H_2O ultrapura en un volumen final de 50µL. Para la segunda ronda de amplificación se siguió el mismo protocolo utilizando 0.25µL de los cebadores Pau_2F y Pau_2R (100µM), una alícuota de 0.5µL de la primera ronda de PCR y 40.25µL de H2O ultrapura (Tabla 2) (Figura A1).

Tabla 2. PCR anidada para pan-coronavirus (Chu et al., 2011).

	Cebadores (5'-3')	Tm(°C)	Ciclado*	Amplicón
PCR_1	Pau_1F GGKTGGGAYTAYCCKAARTG	54.3	94°C 10 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s y 72°C por 40 s. Terminar con 72°C por 10 min.	600 pb
	Pau_1R TGYTGTSWRCARAAYTCRTG	50.2		
PCR_2	Pau_2F GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA	62.9	Mismo ciclado para ambas PCR	440 pb
	Pau_2R CCATCATCAGATAGAATCATCAT	57.5		

*Ciclado modificado a partir de comunicación directa con Paulo Simas, Brasil, 2020.

3.2.2 *Segundo protocolo (Vijgen et al., 2008)*

Se realizó una PCR convencional donde se adicionó 3µL de ADNc a la mezcla de reacción con 5µL de Buffer de PCR 10X, 1µL de MgCl2 (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 4µL de los cebadores COR FW y RV (10 µM), 0.2µL de Taq Platinum® (Invitrogen™) y 31.8µL de H_2O ultrapura en un volumen final de 50µL (Tabla 3) (Figura A2).

Tabla 3. PCR convencional para pan-coronavirus (Vijgen et al., 2008).

	Cebadores (5'-3')	Tm(°C)	Ciclado	Amplicón
PCR	COR FW (+) ACWCARHTVAAYYTNAARTAYGC	54.8	95°C 15 min, luego 50 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s y 72°C por 1 min. Terminar con 72°C por 10 min.	251 pb
	COR RV (-) TCRCAYTTDGGRTARTCCCA	65.3		

3.2.3. *Tercer protocolo (Quan et al., 2010)*

Se realizó una PCR anidada convencional donde se adicionó 3µL de ADNc en 5µL de Buffer de PCR 10X, 1.5µL de MgCl2 (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 4µL de los cebadores QU1 y QU2 (10 µM), 0.2µL de Taq Platinum® (Invitrogen™) y 31.8µL de H_2O ultrapura en un volumen final de 50µL. Para la segunda ronda se siguió el mismo protocolo utilizando 4µL de los cebadores QU3 y QU4 (10

µM), una alícuota de 1µL de la primera ronda de PCR y 33.8µL de H_2O ultrapura (Tabla 4) (Figura A3).

El ciclado fue modificado en base a diferentes condiciones probadas con el control positivo y la enzima utilizada (diferente al protocolo original).

Tabla 4. PCR anidada para pan-coronavirus (Quan et al., 2010).

	Cebadores (5'-3')	Tm(°C)	Ciclado	Amplicón
PCR_1	QU1 CGTTGGIACWAAYBTVCCWYTICARBTRGG	65.3	95°C 15 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 30 s y 72°C por 45 s. Terminar con 72°C por 10 min.	520 pb
	QU2 GGTCATKATAGCRTCAVMASWWGCNACNACATG	69		
PCR_2	QU3 GGCWCCWCCHGGNGARCAATT	61.3	35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 S y 72°C por 45 s. Terminar con 72°C por 5 min.	400 pb
	QU4 GGWAWCCCCAYTGYTGWAYRTC	58.4		

3.2.4 *Cuarto protocolo (Anthony et al., 2015)*

Por último, se llevó a cabo un cuarto análisis PCR semi - anidada convencional utilizando un kit de PCR Fast Cycling (QIAGEN). Brevemente, para la primera ronda se adicionaron 2µL de ADNc en 10µL de Master Mix, 1µL de cada cebador (CoV-FWD3 y CoV-RVS3) y 6µL de H_2O ultra pura en un volumen total de 20µL. En la segunda ronda de amplificación se utilizó el mismo protocolo, adicionando 1µL de cada cebador (CoV-FWD4/Bat, CoV-FWD4/Other y CoV-RVS3), 6.5µL de H_2O ultra pura y 0.5µL de producto de PCR_1 en un volumen total de 20µL (Tabla 5) (Figura A4).

Tabla 5. PCR semi-anidada para pan-coronavirus (Anthony et al., 2015, modificado de Watanabe, S. et al., 2010).

	Cebadores (5'-3')	Tm(°C)	Ciclado	Amplicón
PCR_1	CoV-FWD3 GGTTGGGAYTAYCCHAARTGTGA	56.5	95°C 5 min, 15 ciclos 96°C por 5 s, 65°C (-1°C por ciclo) por 8 s y 68°C por 15 s, luego 35 ciclos de 96°C por 5 s, 50°C por 8 s y 68°C por 15 s. Terminar con 72°C por 3 min.	440 pb
	CoV-RVS3 CCATCATCASWYRAATCATCATA	50.4		
PCR_2*	CoV-FWD4/Bat GAYTAYCCHAARTGTGAYAGAGC	53.8	Mismo ciclado para ambas PCR	434 pb
	CoV-FWD4/Other GAYTAYCCHAARTGTGAUMGWGC	54		
	CoV-RVS3 mismo cebador reverso que la PCR1	50.4		

* debe realizarse utilizando ambos cebadores directos.

3.3 Ensayos para detección de alfavirus

3.3.1. Análisis *de alfavirus en murciélagos*

Un total de 196 muestras correspondientes a las *muestras de archivo de insectívoros* (n= 124) y todas las *muestras nuevas* (n= 72) fueron analizadas para la detección de alfavirus. Para ello, se utilizó una RT-PCR anidada genérica que amplifica una región filogenéticamente informativa del gen nsP4 correspondiente a la polimerasa viral de 195 pb, capaz de detectar una amplia gama de alfavirus: EEEV, WEEV, VEEV, CHIKV, MAYV, etc., de acuerdo a Sánchez-Seco et al., (2001).

Brevemente, para la PCR_1 se adicionó 29.2µL de H_2O ultrapura, 5µL de Buffer de PCR 10X, 1.5µL de $MgCl_2$ (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 4µL de los cebadores ALFA 1+ y 1- (10µM), 0.3µL de Taq Platinum® (Invitrogen™) y 5µL de ADNc en un volumen final de 50µL. Para la PCR_2 se siguió el mismo protocolo utilizando 4µL de los cebadores ALFA 2+ y 2- (10µM), una alícuota de 1µL de la PCR_1 y 33.2µL de H_2O ultrapura (Tabla 6) (Figura A5).

Tabla 6. PCR anidada genérica para alfavirus (Sánchez-Seco et al., 2001).

	Cebadores (5'-3')	Tm (°C)	Ciclado	Amplicón
PCR_1	AlFA1 (+) GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG	62	94°C 2 min, luego 40 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 1 min y 72°C por 30 s. Terminar con 72°C por 5 min.	481 pb
	ALFA1 (-) KYTCYTCIGTRTGYTTIGTICCIGG	65.5		
PCR_2	ALFA2 (+) GIAAYTGYAAYGTIACICARATG	56.3	Mismo ciclado para ambas PCR	195 pb
	ALFA2 (-) GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC	72.2		

Se utilizó como control positivo un extracto de ARN de RNV extraído a partir de un aislado de mosquitos, cedido por el Laboratorio de arbovirus del INVIV, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

A continuación, a las muestras positivas se les realizó una PCR semi-anidada utilizando los cebadores ALFA genéricos, con el fin de obtener amplicones de mayor tamaño y filogenéticamente más informativos (303 y 372 pb). Se utilizó el mismo protocolo descripto para la PCR_2 genérica adicionando 1µL de la PCR_1 (Tabla 7) (Figura A6).

Tabla 7. PCR semi-anidada para alfavirus utilizando cebadores genéricos (modificado de Sánchez-Seco et al., 2001).

	Cebadores (5'-3')	Tm (°C)	Ciclado	Amplicón
SN1	ALFA2 (+) GIAAYTGYAAYGTIACICARATG	56.3	94°C 2 min, luego 40 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 1 min y 72°C por 30 s. Terminar con 72°C por 5 min.	303 pb
	ALFA1 (-) KYTCYTCIGTRTGYTTIGTICCIGG	65.5		
SN2	AlFA1 (+) GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG	62	Mismo ciclado para ambas PCR	372 pb
	ALFA2 (-) GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC	72.2		

Las muestras positivas se enviaron a secuenciar (ver sección "*3.4.2 Secuenciación y análisis filogenéticos*"). En base a las secuencias obtenidas y en un análisis preliminar realizado mediante BLASTn, se procedió a realizar amplificaciones adicionales mediante ensayos específicos para las especies de alfavirus detectadas. Es importante señalar que los protocolos que se describen a continuación no poseen la misma sensibilidad que el ensayo que utiliza cebadores genéricos y, por lo tanto, no se emplean como primera opción para el tamizaje. Sin embargo, se utilizan con el propósito de intentar obtener fragmentos más extensos y/o filogenéticamente más informativos.

A las muestras positivas para RNV se les realizó una RT-PCR anidada para amplificar un fragmento total de 702 pb que codifica la región PE2 (gen E3 y el extremo N de E2), según Pisano et al., (2014). La región que codifica el precursor de la glicoproteína PE2 se seleccionó en función de su alta divergencia, para facilitar una caracterización filogenética más detallada. Para ello, se realizó

una primera PCR (fragmento de 1118 pb), seguido por 2 reacciones anidadas (PCR A y B), utilizando los mismos protocolos descriptos para las $PCR_{1\ y\ 2}$ genérica. La secuencia de interés (702 pb) se resuelve mediante el alineamiento de los productos anidados de 369 y 534 pb, con una superposición de 120 pb (Tabla 8) (Figura A7).

Tabla 8. PCR anidada para VEEV (Pisano et al., 2014).

	Cebadores (5'-3')	Tm (°C)	Ciclado	Amplicón
PCR_1	S8271 (+1) TNGTNGCNATNGTNCTNGGNGGNG	49.2	94°C 2 min, luego 40 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 2 min y 72°C por 30 s. Terminar con 72°C por 5 min.	1118 pb
	A9365 (-1) TNAYNGGYTCNGGNGCNARNGGNAC	61.1		
PCR A	S8328 (+2) TNAYNTGGAMYGANARRGGNGTNAC	53.6	Mismo ciclado que PCR_1	369 pb
	A8676 (-2) ACRTASCCRTCRTGSCCKTCGC	83.2		
PCR B	S8577 (+2) TGTTYAARGARTAYAAGC	34.8		534 pb
	A9086 (-2) CCRCTCAWSGABAGYAWYGWRCTGTC	60.6		

Por otra parte, a las muestras positivas para EEEV se les realizó una RT-PCR semi-anidada utilizando los cebadores específicos para EEEV, modificada del ensayo multiplex desarrollado por De Morais Bronzoni et al., (2005). El primer par de cebadores (M2W y cM3W) hibridan con el gen nsP1, produciendo amplicones de 434 pb, luego en la PCR_2 utilizando el cebador específico de especie para EEEV (nEEE) se obtiene un fragmento final de 124 pb.

Brevemente, en la primera mezcla de reacción se adicionó 8µL de ADNc en 5µL de Buffer de PCR 10X, 2µL de MgCl2 (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 5µL de los cebadores M2W y cM3W (10 µM), 0.5µL de Taq Platinum® (Invitrogen™) y 23.5µL de H_2O ultrapura en un volumen final de 50µL. Para la segunda ronda se siguió el mismo protocolo utilizando 45L de los cebadores nEEE y cM3W (10 µM), una alícuota de 1µL de la primera ronda de PCR y 30.5µL de H_2O ultrapura (Tabla 9) (Figura A8).

Tabla 9. PCR semi-anidada para EEEV (modificado de De Morais Bronzoni et al., 2005).

	Cebadores (5'-3')	Tm (°C)	Ciclado*	Amplicón
PCR_1	M2W (+) YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	59.3	94°C 2 min, luego 35 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1 min y 72°C por 2 min. Terminar con 72°C por 5 min.	434 pb
	cM3W (-) ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	63.9		
PCR_2	nEEE (+) CCACGGTACCGTTGCC	55.9	94°C 2 min, luego 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 2 min. Terminar con 72°C por 5 min.	124 pb
	cM3W mismo cebador reverso que PCR_1	-		

*Modificaciones de Ta respecto al protocolo original.

3.3.2. *Análisis de alfavirus en mosquitos*

3.3.3. *Capturas de mosquitos*

Con el fin de explorar el posible rol de los murciélagos en el ciclo de los alfavirus en el país, se realizaron capturas de mosquitos en los alrededores de las colonias de murciélagos muestreadas. Las capturas se realizaron en los departamentos de Rivera y Florida (Figura 13) en los meses de verano, otoño y primavera. Se utilizaron dos métodos de captura: captura manual, y capturas con trampas tipo CDC adicionadas con luz y una fuente de CO_2 (fermentación de levadura seca con agua tibia y azúcar, tapado con una malla que permita la emisión, pero no el ingreso de los mosquitos, y colgado al costado de la trampa), u otro atrayente de mosquitos como Octenol (1-Octen-3-ol) el cual actúa como atrayente de mosquitos imitando la respiración humana (Rubio-Palis et al., 2015) colocado junto al ventilador de la trampa (Figura 12). Se colocaron de 1 a 3 trampas por captura y se mantuvieron de 1 a 3 noches (aproximadamente de 18h a 8h del día siguiente). Los ejemplares capturados se mantuvieron a -20°C durante el traslado al laboratorio y luego permanecieron a -80°C en tubos 1.5mL estériles hasta su posterior clasificación.

Figura 12. Ejemplo de una trampa para mosquitos tipo CDC adicionada con luz y recipientes con levadura fermentando como fuente de CO_2. En el caso de agregar Octenol como atrayente, se coloca en una rejilla junto a la lámpara.

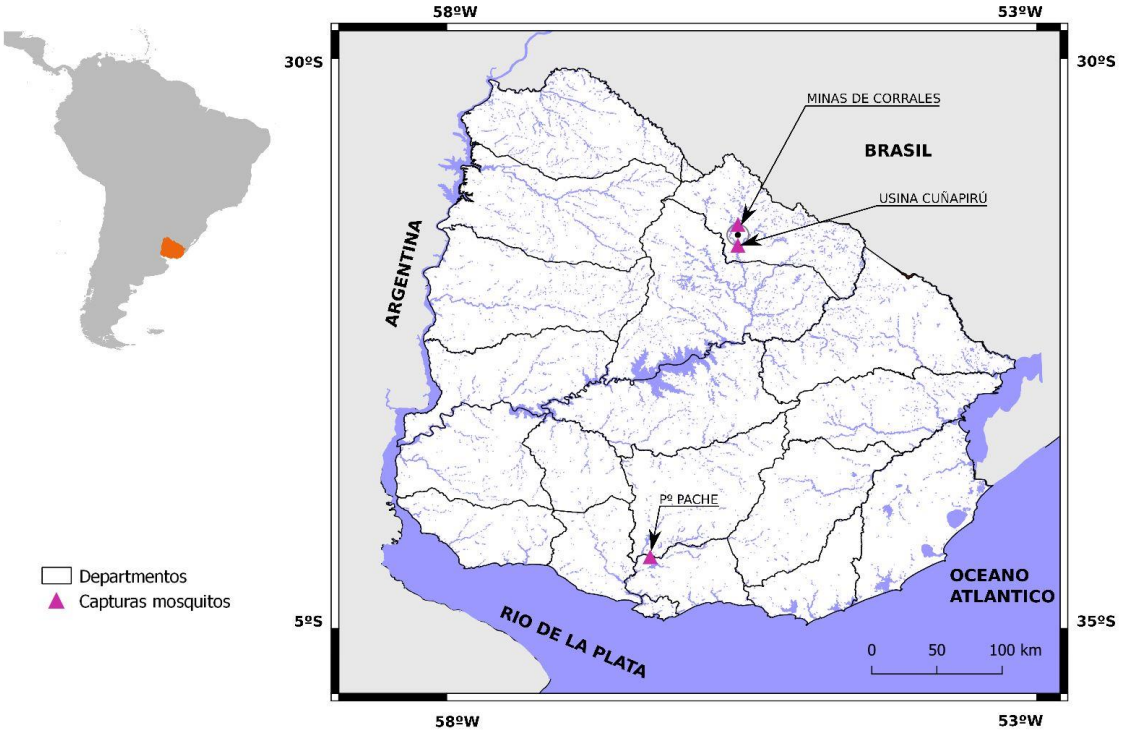


Figura 13. Distribución geográfica de las capturas de mosquitos en las inmediaciones de las colonias de murciélagos muestreadas en Uruguay. Departamento de **Rivera**: Minas de Corrales y Usina Cuñapirú, **Florida**: Paso Pache.

3.3.4. *Procesamiento de los mosquitos*

Los ejemplares se clasificaron manteniendo la cadena de frío mediante la colocación de baño de agua-hielo debajo de la placa de Petri y utilizando luz de fibra óptica. Luego, se prepararon los *pooles* de mosquitos (de 1 hasta 50 ejemplares por *pool*) utilizando los criterios de: a. localidad, b. especie, c. sexo, c1. machos, c2. hembras alimentadas de sangre y c3. hembras no alimentadas.

La identificación taxonómica se realizó con la colaboración de la Mag. Mónica Remedios de León en la Sección Entomología de Facultad de Ciencias, UdelaR, utilizando el "Manual De Culícidos (Diptera: Culicidae) De La Zona Norte Y Centro De Chile, Incluyendo Isla De Pascua" (Christian R. González et al., 2016) y el Catálogo online de Mosquitos de Argentina y Uruguay (Campos R. E., Laurito M. & Muttis E., 2023).

Los *pooles* fueron triturados utilizando pequeños morteros de polipropileno autoclavables ("pellet pestles") y homogeneizados con 1mL de medio de cultivo celular Eagle Minimal Essential Medium (EMEM, Gibco®, Invitrogen ™). Luego, fueron clarificados por centrifugación durante 30

minutos a 10000 rpm (4°C). Se recogió el sobrenadante de cada *pool* (homogeneizado de mosquitos) en un tubo de 1.5mL estéril y se almacenó a -80°C hasta el momento de la extracción.

3.3.5. *Extracción de ARN total y análisis moleculares*

La extracción de ARN total se realizó a partir de 200µL del homogeneizado de mosquitos por el método de Trizol® (Invitrogen ™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos de ARN fueron procesados mediante los mismos ensayos de RT-PCR anidada genérica y semi-anidada para alfavirus utilizados en el análisis de las muestras de murciélagos.

3.4. Análisis de los productos de amplificación

3.4.1. *Electroforesis*

Todos los productos de RT-PCR obtenidos se visualizaron utilizando 5µL de cada PCR_2 en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X y teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen™), utilizando como marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb Plus/DNA Ladder (Invitrogen™). Los productos se revelaron bajo luz UV y se tomaron fotografías utilizando el programa Carestream (Molecular Imagin Software).

3.4.2. *Secuenciación y análisis filogenéticos*

Las muestras que presentaron un amplicón de tamaño esperado tanto para coronavirus como para alfavirus, se enviaron a purificar y secuenciar a la empresa Macrogen Inc., Seúl, Corea, utilizando 5pmol/µL de los mismos cebadores utilizados para la amplificación, y siguiendo sus requisitos de envío. En caso de detectar bandas inespecíficas en la electroforesis, previo a la secuenciación, se cortaron del gel de agarosa las bandas de tamaño esperado y se purificaron utilizando el kit comercial MinElute™ Gel Extraction (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante.

Las secuencias se revisaron y editaron con los softwares BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) y MEGA v.11.0.13 (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021), se compararon con las secuencias obtenidas de la base de datos GenBank utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica de nucleótidos (BLASTn) (Camacho et al. 2009) (Tablas 1 y 2. ANEXO). Los alineamientos de secuencias de RdRp para CoV y de nsP4 para alfavirus se construyeron utilizando ClustalW (Thompson et al. 1994), y se realizaron en base a las secuencias de las muestras positivas obtenidas en este estudio, junto con un conjunto de secuencias representativas de ambas familias recuperadas de GenBank. Para estimar el modelo más adecuado de sustitución de nucleótidos se utilizó la selección automática de modelo por SMS (Lefort et al., 2017), y la reconstrucción filogenética se realizó bajo el criterio de máxima verosimilitud (ML), utilizando el software PhyML v3.0 (Guindon et al. 2010). Los soportes

estadísticos de los nodos del árbol se calcularon mediante la prueba de razón de verosimilitud aproximada (aLRT).

3.5. Puesta a punto de ensayos de titulación de alfavirus en cultivo celular

Con el objetivo de realizar ensayos serológicos de neutralización para la detección de anticuerpos contra los virus RNV y EEEV, se realizó el ensayo de titulación viral en cultivo celular. En primer lugar, mediante plaqueo viral y luego por el método de dosis infecciosa de tejido al 50% ($TCID_{50}$, por sus siglas en inglés) utilizando el cálculo de Reed-Muench (1938).

Para los ensayos se utilizó la línea celular Vero (línea celular continúa derivada de células epiteliales del riñón del mono verde africano (*Chlorocebus sp*.), desarrolladas por Yasumura y Kawakita en 1962; y se empleó un aislado de mosquitos del virus Río Negro (complejo VEEV) cedido por la Dra. Lorena Spinsanti, del Laboratorio de Arbovirus del INVIV, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

3.5.1. *Línea celular y generación de stock viral de RNV*

Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco®, Invitrogen™) con bajo contenido de glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibióticos (ATB). Se incubaron en estufa a 37°C y una atmósfera de CO_2 al 5% (condiciones estándar de cultivo).

Para producir el stock, se infectaron dos botellas de 75 cm^2 de células Vero que presentaban un monocapa celular semiconfluente y se inocularon con 500µL de RNV (de título desconocido) durante 1h a 37°C y 5% CO_2, agitando suavemente cada 15 minutos. Después de la adsorción, se retiró el inóculo y se añadió a cada botella 20mL de medio de mantenimiento (DMEM 2% SFB y 1% ATB) y se incubó a 37° y 5% CO_2. A las 72h se observó un claro efecto citopático (ECP), se cosecharon las células infectadas mediante raspado y se almacenaron en alícuotas a -80°C hasta su posterior utilización.

Para confirmar la infección se realizó la extracción de ARN total mediante kit comercial RT-PCR anidada genérica para alfavirus (mismos protocolos utilizados para el análisis de las muestras de murciélagos).

3.5.2. *Titulación de RNV*

3.5.3. *Plaqueo viral*

Se realizó el ensayo de titulación de RNV mediante plaqueo viral (protocolo cedido por el Laboratorio de arbovirus del INVIV, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba con modificaciones). Se utilizó alícuotas de la cosecha de RNV generadas para el stock viral.

Se sembraron placas de 24 pocillos con 1.5 a $3x10^5$ células Vero (clon 76, E6 y CCL181) por pocillo, luego de 24h se infectaron con diluciones seriadas en base 10 (300 µL/pocillo) de la cosecha de RNV generadas para el stock viral en medio de infección (DMEM 0% SFB y 1% ATB). Se partió con diferentes diluciones (10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-7}), cada dilución fue inoculada por duplicado dejando 2 pocillos de células control sin infectar (Figura 14A). Tras una hora de adsorción viral a 37°C y 5% CO_2, se retiró el inóculo y se añadió 1 mL/pocillo de medio "overlay" (MEM-E 2X + 2%ATB + 4%SF con metil-celulosa (3.2, 4, 6 y 8%) o agarosa al 1%, en un volumen 1:1). La placa se incubó en condiciones estándar de cultivo hasta las 72h, se fijó con 500 mL/pocillo con solución de fijación (4% formaldehido en 0.15M NaCl) durante 24h (mínimo). Se retiró el medio de fijación y se tiñó con 0.5 mL/pocillo de cristal violeta al 1% en metanol 40%.

3.5.4. *TCID50%*

Se realizó el ensayo de titulación viral en cultivo celular mediante el método de dosis infecciosa de tejido al 50% ($TCID_{50}$ en inglés) utilizando el cálculo de Reed-Muench (1938).

Se sembraron $3x10^5$ células Vero por pocillo en una placa M96, luego de 24h se infectaron con diluciones seriadas en base 10 (100 µL/pocillo) de la cosecha de RNV generadas para el stock viral en medio de infección (DMEM 0% SFB y 1% ATB), partiendo con una dilución 10^{-5} hasta 10^{-16}. Cada dilución fue inoculada por septuplicado y paralelamente fue incluido un control negativo (células sin infectar) y un pocillo control positivo con inoculo de virus puro (Figura 14B). Tras una hora de adsorción viral a 37°C y 5% CO_2, se retiró el inóculo y se añadió 200 µL/pocillo con medio de mantenimiento. La placa se incubó en condiciones estándar de cultivo hasta las 72h, donde se determinó la cantidad de pocillos infectados mediante la visualización del ECP del virus al microscopio óptico y con lo cual se calculó la TCID50% mediante el análisis estadístico de Reed y Muench.

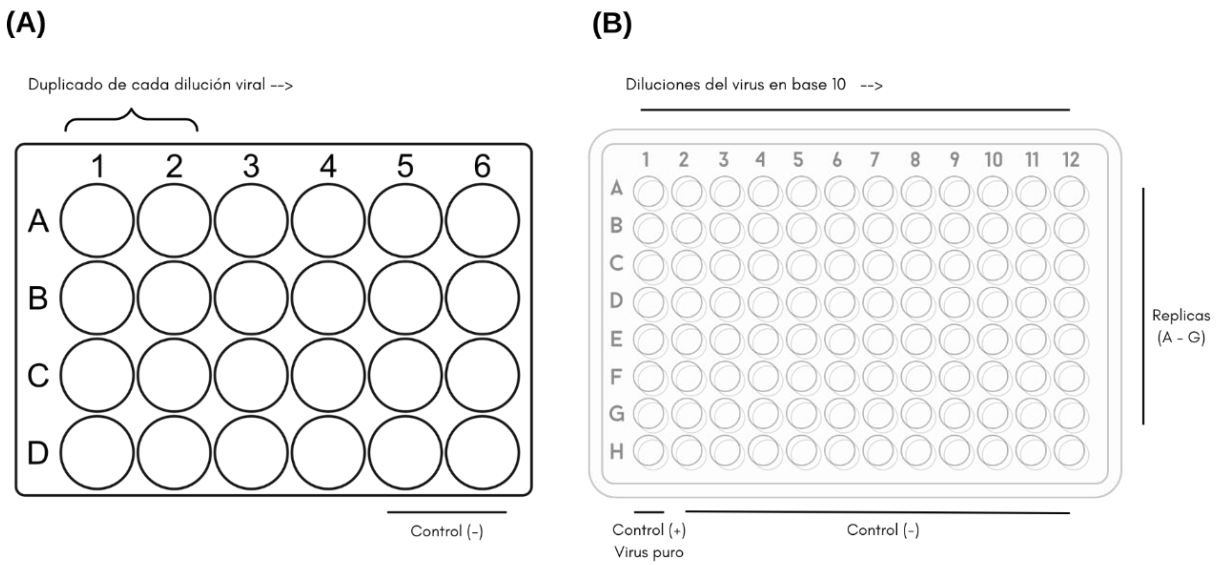


Figura 14. Diagrama en placa de los ensayos de titulación por Plaqueo viral y $TCID_{50}$. (A) Placa de 24 pocillos, se realizaron 11 diluciones por duplicado, y se dejaron 2 pocillos sin infectar como control negativo. **(B)** Placa de 96 pocillos, se realizaron 12 diluciones por columna (1 a 12) con 7 réplicas cada una (A – G). Se dejaron 11 pocillos sin infectar como control negativo (H2 a H12), y un control positivo de virus puro (H1).

4 Resultados

Colecta de muestras

Se obtuvo un total de 329 muestras de hisopados orales (n= 292) y anales (n= 37) de 12 especies autóctonas de murciélagos uruguayos muestreados entre los años 2017 y 2022 (*total de muestras de archivo y nuevas*) (Tabla 10).

Tabla 10. Número total y tipo de muestras por especie de murciélagos.

Familia	Género/Especie	Oral	Anal	N
Vespertillionidae	*E. furinalis*	12	2	14
	E. diminutus	3	0	3
	E. montanus	6	0	6
	L. blossevillii	1	0	1
	L. ega	3	1	4
	M. pampa	1	0	1
	Myotis spp.	53	10	63
Molossidae	*E. bonariensis*	4	2	6
	M. temminkii	6	0	6
	M. molossus	10	5	15
	T. brasiliensis	55	12	67
Phyllostomidae	*D. rotundus*	138	5	143
Total	**12**	**292**	**37**	**329**

- *Muestras de archivo*

Se analizaron 257 muestras de hisopados orales (n= 256) y una de hisopado anal, recolectadas entre 2017 y 2019 en 10 departamentos del país (Artigas, Canelones, Cerro Largo, Lavalleja, Maldonado, Montevideo, Río Negro, Rivera, Soriano y Treinta y Tres) (Figura 11). Del total, 124 correspondieron a murciélagos insectívoros de 11 especies (*Eumops bonariensis, Molossops tenminkii, Molossus molossus, Tadarida brasiliensis, Eptesicus diminutus, E. furinalis, E. montanus, Lasiurus blossevilli, L. ega, Myotis pampa y Myotis sp*. (complejo *Myotis albescens y Myotis levis*)) (Tabla 11), mientras que los 133 restantes correspondieron al murciélago hematófago vampiro común (*Desmodus rotundus*) (Tabla 12).

Tabla 11. Muestras de archivo de hisopados orales de murciélagos insectívoros autóctonos indicando la localidad, departamento y fecha de colecta.

Familia	Especie	N° de muestras		Localidad	Departamento	Año
		Oral	Anal			
Vespertillionidae	*E. furinalis*	4		Arroyo Tres cruces	Artigas	2018
		3		Javier de Viana	Artigas	
		2		Estancia El Molino	Soriano	
		1		Cerro Cuñapirú	Rivera	
	E. diminutus	3		Estancia El Molino	Soriano	2018
	E. montanus	5		Estancia Los Matreros	Maldonado	2018
		1		Gruta de Lázaro	Cerro Largo	2019
	L. blossevillii	1		Javier de Viana	Artigas	2018
	L. ega	2		Javier de Viana	Artigas	2018
		1	1*	Estancia El Molino	Soriano	
	M. pampa	1		Paso Manuel Díaz	Rivera	2018
	Myotis spp.	14		Javier de Viana	Artigas	2018
		1		Arroyo Tres cruces	Artigas	
		14		Usina Cuñapirú	Rivera	
		1		Estancia El Molino	Soriano	
		1		Grutas de Salamanca	Maldonado	
		2		Cueva de la Tigra	Cerro Largo	2019
		2		Isla La Gotera	Cerro Largo	
		7		Usina Cuñapirú	Rivera	
		1		N/A**	N/A	N/A
Molossidae	*E. bonariensis*	1		Javier de Viana	Artigas	2018
		1		Estancia El Molino	Soriano	
	M. temminkii	3		Javier de Viana	Artigas	2018
		3		Estancia El Molino	Soriano	
	M. molossus	2		Estancia Los Matreros	Maldonado	2018
		2		Palmares Caranday	Río Negro	2019
		1		El Pinar	Canelones	N/A
	T. brasiliensis	24		Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		1		La Unión	Montevideo	
		12		Usina Cuñapirú	Rivera	2019
		3		San Javier	Río Negro	
		1		Malvin	Montevideo	
		2		N/A	N/A	N/A
Total		**124**				

*Única muestra anal tomada durante este período.

** N/A: datos no disponibles.

Tabla 12. Muestras de archivo de hisopados orales de murciélagos hematófagos autóctonos indicando la localidad, departamento y año de colecta.

Familia	Especie	N° muestras orales	Localidad	Departamento	Año
Phyllostomidae	*D. rotundus*	10	Mina de Oro	Lavalleja	2017
		12	Parque Salus		
		15	Cañada entubada		
		6	Sierra de Caracoles	Maldonado	
		32	Grutas de Salamanca		
		3	Arroyo Tres Cruces	Artigas	2018
		2	Parque Salus	Lavalleja	
		2	Cerro Minuano		
		7	Grutas de Salamanca	Maldonado	
		1	Cañadón		
		5	Pan de Azúcar		
		5	Usina Cuñapirú	Rivera	
		8	Gruta de Lázaro	Cerro Largo	2019
		10	Grieta de los murciélagos		
		3	Estancia de Álvarez		
		4	Cerro del Toro	Maldonado	
		8	Isla Patrulla	Treinta y Tres	
Total		**133**			

- *Muestras nuevas*

Se analizaron 72 muestras de hisopados orales (n= 36) y anales (n= 36) de murciélagos autóctonos de nuestro país, obtenidas durante el año 2022 en 5 departamentos (Canelones, Lavalleja, Montevideo, Rivera y Rocha) correspondientes a 6 especies de murciélagos insectívoros y hematófago (*E. furinalis, Myotis spp., E. bonariensis, M. molossus, T. brasiliensis y D. rotundus*) (Tabla 13; Figura 11).

Tabla 13. Muestras nuevas de hisopados orales y anales de murciélagos autóctonos indicando la localidad, departamento y fecha de colecta.

Familia	Especie	N° de muestras		Localidad	Departamento	Año
		Oral	Anal			
Vespertillionidae	*E. furinalis*	2	2	Cerritos	Rocha	2022
	Myotis spp.	6	6	Usina Cuñapirú	Rivera	
		1	1	Arroyo Cuñapirú		
		2	2	Paso Pache	Florida	
		1	1	Cerritos	Rocha	
Molossidae	*E. bonariensis*	2	2	Paso Pache	Florida	
	M. molossus	1	1	Cerritos	Rocha	
		3	3	Paso Pache	Florida	
		1	1	Camping Arequita	Lavalleja	
	T. brasiliensis	9	9	Usina Cuñapirú	Rivera	
		3	3	Complejo Zapicán	Montevideo	
Phyllostomidae	*D. rotundus*	5	5	Usina Cuñapirú	Rivera	
Total		**72**				

Retrotranscripción

Todas las muestras de murciélagos (*de archivo y nuevas*), junto con los controles positivos de CoV (IBV) y alfavirus (RNV), fueron retrotranscriptas utilizando *random primers* a fin de servir como ADNc para los ensayos de RT-PCR de panCoV y alfavirus genérica correspondientes.

Ensayos Coronavirus

Detección en murciélagos

Tamizaje por PCR

Para la búsqueda de CoV se utilizó un extracto de ARN de IBV como control positivo con el cual se realizó la puesta a punto de 4 protocolos de RT-PCR dirigidos a amplificar una región conservada de la polimerasa viral (RdRp) (Chu et al., 2011; Vijgen et al., 2008; Quan et al., 2010; Anthony et al., 2015) con el fin de encontrar el más adecuado para la identificación en murciélagos de nuestro país. En la Figura 16 se muestra la amplificación de los controles con los 4 protocolos ensayados.

Con respecto al primer protocolo (Chu et al., 2011) no se obtuvo el tamaño de amplicón esperado de 440 pb con la muestra control, y se obtuvo fragmentos de ~600 pb en todos los ensayos, lo cual corresponde al tamaño del amplicón de la PCR_1 (Figura 15A). El segundo protocolo (Vijgen et al., 2008) y el tercer protocolo (Quan et al., 2010) resultaron exitosos en la amplificación del control positivo de IBV, con tamaños de amplicones esperados de aproximadamente 251 pb y 400 pb, respectivamente. En ambos se muestran dos carriles de amplificación del control positivo utilizando cebadores específicos y *random primers* en la RT (Figura 15 B y C). Sin embargo, ambos protocolos no fueron exitosos al momento de amplificar un subconjunto de las muestras totales. Finalmente, se utilizó el cuarto protocolo de RT-PCR anidada para panCoV de Anthony et al., (2015) (con modificaciones) (Figura 15C), con el cual se analizaron las 329 muestras de hisopados orales y anales provenientes de murciélagos.

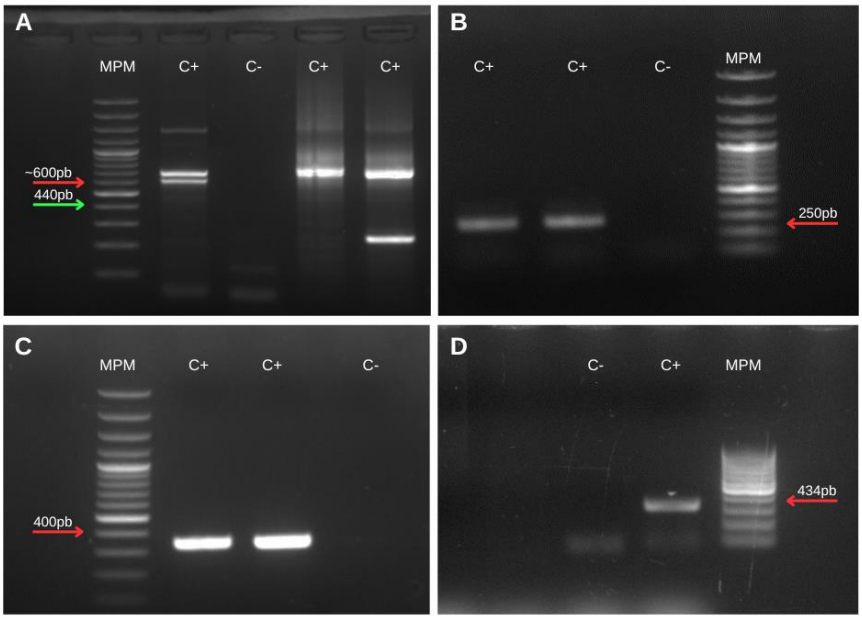


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Amplificación del control de IBV a partir de los cuatro protocolos utilizados: **A)** Primer protocolo (Chu et al., 2011), carriles 1: 1:100, 2: 1:500, 3: 1:1000 (diluciones del C+). Tamaño obtenido de amplicón de ~600 pb, tamaño esperado 440 pb; **B)** segundo protocolo (Vijgen et al., 2008), carriles 1: RT cebadores específicos, 2: RT *random primers.* Tamaño esperado 251 pb; **C)** tercer protocolo (Quan et al., 2010), carriles 1: RT con cebadores específicos, 2: RT con *random primers.* Tamaño esperado 400 pb. MPM: GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen™). **D)** cuarto protocolo (Anthony et al., 2015) tamaño esperado 434 pb. C+: control positivo; C-: control negativo; y GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™).

Los resultados del tamizaje por RT-PCR anidada de las 329 muestras estudiadas, mostraron que una muestra de hisopado oral (1/329) resultó positiva para CoV, la cual correspondió al murciélago insectívoro *Molossus molossus* (LMC122) capturado en el Departamento de Río Negro (Palmares de Caranday) en el año 2019 (muestras de archivo – insectívoros) (Figura 16).

Secuenciación y análisis filogenético

La secuencia del producto de amplificación (LMC122), correspondiente a un fragmento de 411 pb del gen RdRp, comparada con la base de datos del GenBank (Blastn) reveló que compartía un alto grado de similitud de secuencia con los AlfaCoV informados previamente en murciélagos de América del Sur.

La secuencia LMC122 fue editada y alineada junto con 70 secuencias parciales y completas obtenidas de GenBank, provenientes de ejemplares de murciélagos y otros vertebrados, seleccionadas por ser representativas de la diversidad de la subfamilia *Orthocoronavirinae* (Tabla 1. ANEXO). La filogenia de máxima verosimilitud (Figura 17) mostró que, de acuerdo a lo esperado, las secuencias se subdividieron en los 4 géneros Alfa-, Beta-, Gamma- y DeltaCoV. LMC122 se agrupó con alto respaldo estadístico (aLRT = 1) dentro del clado de AlfaCoV. Las secuencias más

emparentadas con LMC122 (aLRT= 0.95) fueron recuperadas a partir de individuos de la misma especie (*M. molossus*) colectados en el sur de Brasil en 2009 (KX094984.1) y en Buenos Aires, Argentina en 2020 (OP169153.1). Estas secuencias se agruparon a su vez en un clado mayor, con alto soporte estadístico (aLRT= 0.99) que incluye AlfaCoVs obtenidos de murciélagos *Myotis sp.* de Jujuy, Argentina (ON256704), *M. rufus* del sur de Brasil (KC886321, MH974769, MH974764), y *T. brasiliensis* de Chubut, Argentina (OP169165).

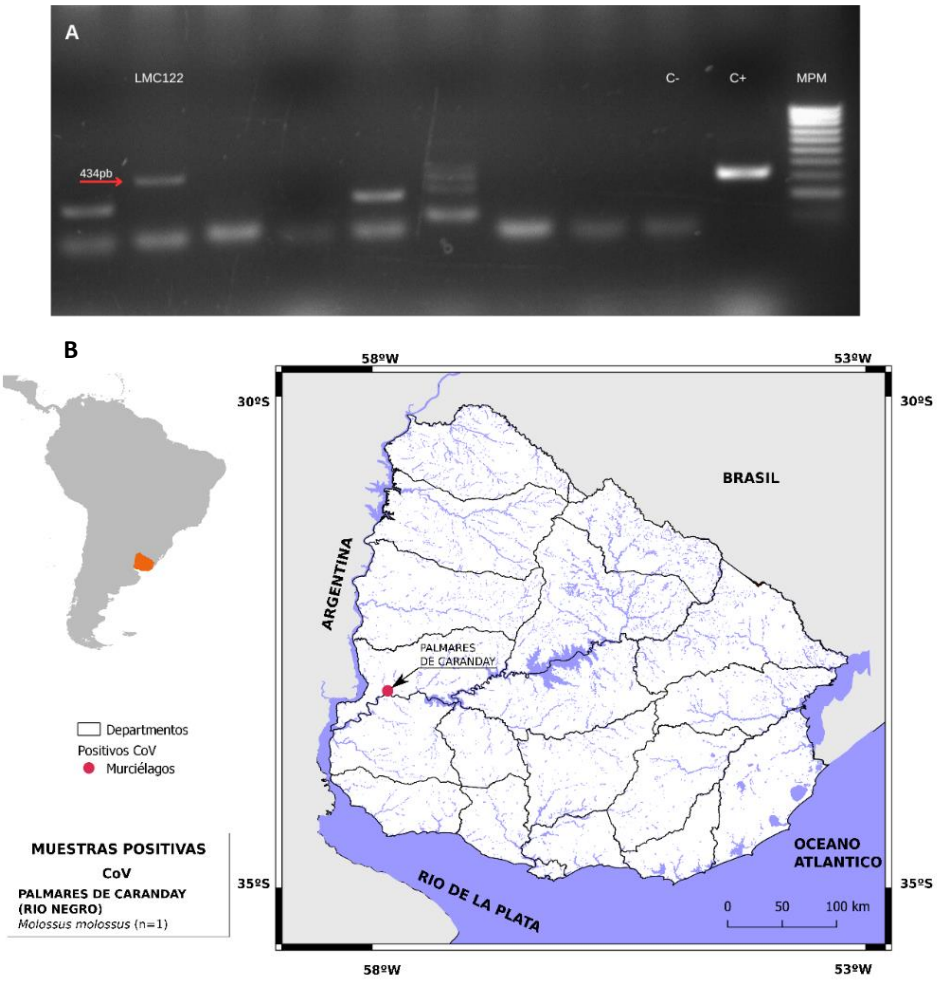


Figura 16. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Detección del gen RdRp de la subfamilia *Orthocoronavirinae* por RT-PCR semi-anidada para panCoV (Anthony et al., 2015). LMC122: BatCoV detectado a partir de hisopado oral de *M. molossus.* C+: control positivo; C-: control negativo; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler de 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen ™). **B) Mapa de Uruguay con la localidad donde se detectó CoV en murciélagos.** A la izquierda se detalla la especie y localidad de captura.

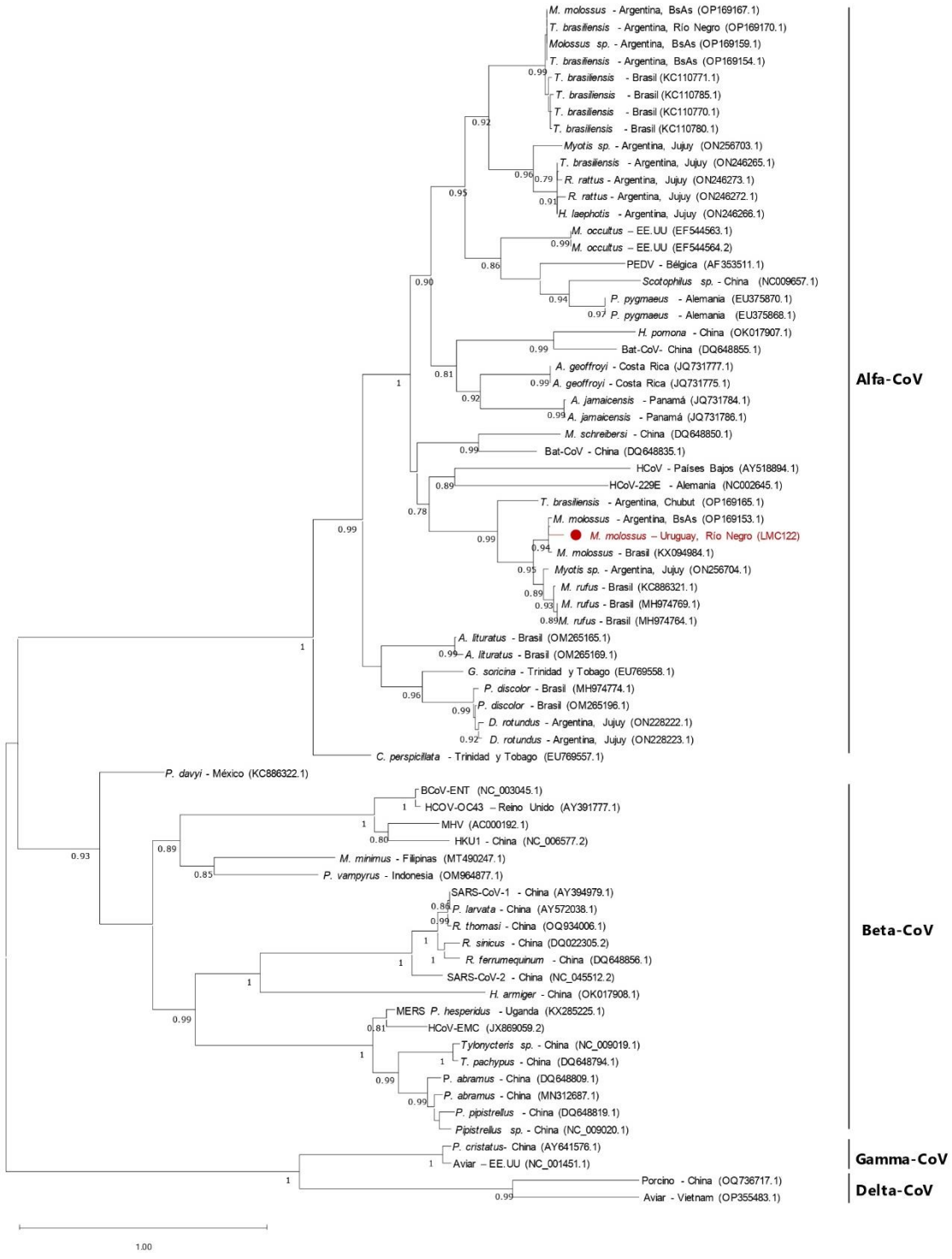


Figura 17. **Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias parciales de RdRp de la subfamilia *Orthocoronavirinae*.** El análisis incluye la secuencia obtenida en este trabajo y setenta y dos secuencias depositadas en GenBank de Orthocoronavirus identificados en diferentes vertebrados (Tabla 1. ANEXO). La filogenia se reconstruyó bajo el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. Los soportes de clados se estimaron a través de la prueba de razón de verosimilitud aproximada (aLRT), y solo se muestran los que están por encima de 0.75. Como grupo externo se utilizaron virus aviares de los géneros Gamma- y DeltaCoV. La especie y localidad de captura del CoV detectado en este trabajo se representan como LMC122 en color rojo (411 pb). Alineamiento en base a secuencias parciales y completas (31511 pb).

Detección en murciélagos

Tamizaje por PCR

Para la detección de alfavirus mediante RT-PCR anidada genérica se analizaron un total de 196 muestras de hisopados orales (n= 159) y anales (n= 37) de 12 especies autóctonas de murciélagos uruguayos muestreados entre 2018 y 2022 (muestras de archivo- insectívoros y total de nuevas). En la Figura 18 se muestran los productos de amplificación del gen nsP4 (195 pb) de los controles y algunas de las muestras analizadas.

De las 196 muestras analizadas, 23 resultaron positivas, recuperadas de murciélagos de 8 especies. La distribución de muestras positivas por especies fue la siguiente: *T. brasiliensis* (n= 8/67, 11.9%), *Myotis spp.* (n= 7/63, 11%), *E. furinalis* (n= 3/14, 21.4%), *D. rotundus* (n= 1/5, 20%), *E. montanus* (n= 1/6, 16.6%), *M. temminckii* (n= 1/6, 16.6%), *E. bonariensis* (n= 1/6, 16.6%) y *M. molossus* (n= 1/15, 6.6%). De estas, 20 (~87%) se detectaron en hisopados orales y 3 (~13%) en hisopados anales. Los individuos positivos fueron capturados en 8 departamentos: Artigas, Florida, Lavalleja, Maldonado, Montevideo, Rivera, Rocha y Soriano (Figura 22).

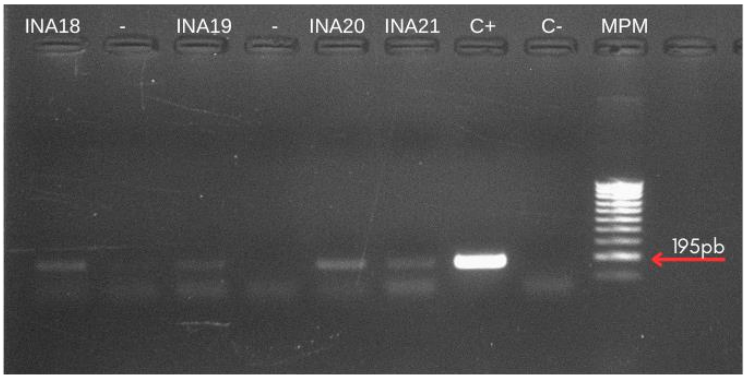


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Detección del gen nsP4 de alfavirus por RT-PCR anidada genérica (Sánchez-Seco et al., 2001) a partir de muestras de hisopados orales y anales en murciélagos uruguayos. Carriles 1 a 6: muestras, las positivas con código INA*; C+: control positivo; C-: control negativo; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler de 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen ™).

A continuación, se realizaron intentos de amplificación de regiones más amplias del gen nsP4 utilizando dos RT-PCR semi-anidadas genéricas (SN1 303 pb y SN2 372 pb), modificado de Sánchez-Seco et al., 2001. En la Figura 19 se muestran los amplicones del gen nsP4 obtenidos a partir de las PCR semi-anidadas SN1 y SN2.

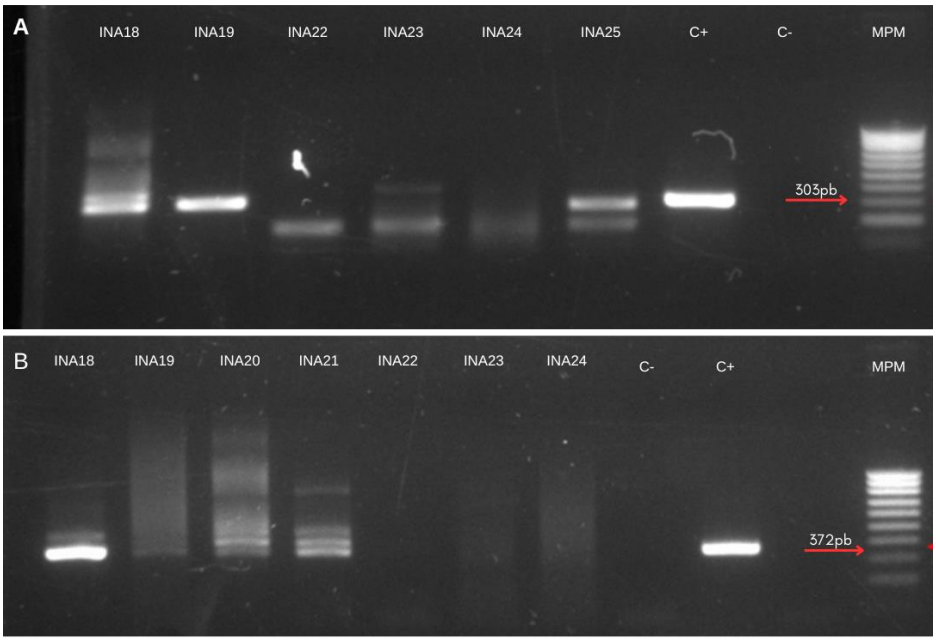


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Amplificación de regiones más amplias del gen nsP4 utilizando dos RT-PCR semi-anidadas genéricas (modificado de Sánchez-Seco et al., 2001): **A)** SN1 303pb y **B)** SN2 372 pb. Carriles 1 a 7: muestras positivas por RT-PCR anidada genérica; C+: control positivo; C-: control negativo; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen ™).

Se logró amplificar un fragmento mayor en 10 de las 23 secuencias positivas: INA18,19, 20,21, 25, 26, 29, 52, 59 Y DA1. En la siguiente tabla se desglosan las muestras positivas por especie de murciélago, con sus respectivos códigos y tipos de muestra, localidad y fecha de captura. Al ensamblar los fragmentos obtenidos junto a los amplicones de la PCR genérica se obtuvo secuencias entre 205 y 402 pb (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados de alfavirus en murciélagos. Se muestran las familias y especies de murciélagos, resultados y tamaños de secuencias, códigos y tipo de muestra, sitios y años de recolección.

Familia	Género/Especie	Resultado (Blastn)	Muestra	Localidad	Departamento	Año
Molossidae	*T. brasiliensis*	RNV 402pb	INA18/ Oral			
		RNV 399pb	INA19/ Oral			
		RNV 192pb	INA22/ Oral	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		RNV 187pb	INA24/ Oral			
		RNV 150pb	INA35/ Oral			
		RNV 234pb	INA25/ Oral	La Unión	Montevideo	2018
		RNV 174pb	INA60/ Oral	Usina Cuñapirú	Rivera	2022
		RNV 173pb	INA63/ Anal			
	M. temminckii	RNV 153pb	INA28/ Oral	Estancia El Molino	Soriano	2018
	M. molossus	RNV 355pb	INA59/ Oral	Camping Arequita	Lavalleja	2022
	E. bonariensis	EEEV 205pb	INA52/ Anal	Paso Pache	Florida	2022
Vespertillionidae	*Myotis spp.*	RNV 169pb	INA23/ Oral			
		RNV 290pb	INA26/ Oral			2018
		EEEV 355pb	INA29/ Oral	Usina Cuñapirú	Rivera	
		RNV 197pb	INA57/ Oral			2022
		RNV 195pb	INA58/ Oral			
		RNV 153pb	INA27/ Oral	Javier de Viana	Artigas	2018
		RNV 191pb	INA36/ Oral	Grutas de Salamanca	Maldonado	
	E. montanus	RNV 169pb	INA37/ Oral	Los Matreros	Maldonado	2018
	E. furinalis	RNV 339pb	INA20/ Oral	Estancia El Molino	Soriano	2018
		RNV 339pb	INA21/ Oral	Cerro Cuñapirú	Rivera	2018
		RNV 198pb	INA51/ Anal	Cerritos de Indios	Rocha	2022
Phyllostomidae	*D. rotundus*	RNV 378pb	DA1/ Oral	Usina Cuñapirú	Rivera	2022
Total		**21 RNV/2 EEEV**	**20 Oral/3 Anal**	**10**	**8**	

Análisis de secuencias

El análisis preliminar de las 23 secuencias obtenidas comparadas con la base de datos del GenBank (Blastn) reveló que mostraban un alto grado de similitud con secuencias de RNV, complejo VEEV (n= 21, oral= 19, anal= 2) y EEEV linaje I (n= 2, oral= 1, anal= 1), previamente identificadas en mosquitos y vertebrados de América del Sur y del Norte. Por otro lado, se intentó la obtención de secuencias más informativas mediante la realización de un ensayo de RT-PCR anidada específica para las muestras positivas de RNV, siguiendo el protocolo descrito por Pisano et al., (2014). Sin embargo, no se logró obtener amplificación en ninguna de las muestras. De manera similar, se realizó un ensayo de RT-PCR anidada modificada de De Morais Bronzoni et al., (2005), a las muestras positivas de EEEV, pero tampoco se obtuvo amplificación.

Procesamiento de mosquitos

Se colectaron un total de 40 mosquitos (Diptera: Culicidae) en 5 capturas realizadas en los departamentos de Florida y Rivera durante el año 2022. Los ejemplares fueron identificados como *Culex sp.* (complejo *pipiens/quinquefasciatus*) (n= 19), *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (n= 17) *y Mansonia sp.* (n=4). Los individuos dañados con falta de caracteres taxonómicos identificatorios se clasificaron solo a nivel de género. El procesamiento se hizo para cada trampa colocada individual, y se clasificó especie y sexo, lo que permitió agrupar a los ejemplares en un total de 12 *pooles*. De los 40 ejemplares colectados, 38 correspondieron a hembras, 1 hembra alimentada y 1 macho (Tabla 15).

La distribución de los mosquitos por localidad y fecha de captura se presenta en la siguiente tabla y a continuación se desglosan las capturas por departamento.

Tabla 15. **Capturas de mosquitos durante las capturas de murciélagos en 2022.** Se muestran los *pooles*, fecha y localidad de captura, género y/o especie, sexo, número de mosquitos, método de captura y código de las secuencias positivas.

pool	Fecha captura	Localidad[1]	Género Especie	H, HA, M[2]	N° de mosquitos	Método de captura
1	28/2/2022	Usina Cuñapirú	*Culex spp.*	H	1	Trampa CDC con luz y levadura
2			*Culex spp.*	H	2	Trampa CDC con luz y levadura
3			*Culex spp.*	H	11	Trampa CDC con luz y levadura
4			*Culex spp.*	HA	1	Trampa CDC con luz y levadura
5			*Culex spp.*	M	1	Trampa CDC con luz y levadura
6			*Culex spp.*	H	1	Trampa CDC con luz y levadura
7			*Culex spp.*	H	1	Trampa CDC con luz y levadura
8	30/4/2022	Paso Pache	*Mansonia sp.*	H	2	Trampa CDC con luz y levadura
9			*Mansonia sp.*	H	2	Trampa CDC con luz y levadura
10	4/9/2022	Paso Pache	*Ae. (Oc.) albifasciatus*	H	1	Trampa CDC con luz y levadura
11	2/11/2022	Minas de Corrales	*Culex spp.*	H	1	Trampa CDC con luz y levadura
12	21/12/2022	Paso Pache	*Ae. (Oc.) albifasciatus*	H	16	Trampa CDC con luz y Octenol/ captura manual
Total					**40**	

[1]Usina Cuñapirú, Rivera; Paso Pache, Florida; Minas de Corrales, Rivera.

[2] H: hembras no alimentadas, HA: hembras alimentadas, M: machos.

Detección de alfavirus en pooles de mosquitos

Tamizaje por PCR

Se extrajo el ARN total de los 12 *pooles* de mosquitos y se analizaron mediante RT con *random primers* y PCR anidada genérica para alfavirus (mismo protocolo utilizado para el tamizaje de murciélagos, Sánchez-Seco et al., (2001)). Se obtuvo 2 *pooles* positivos, MOA3 (*pool* 10) y MOA4 (*pool* 12), correspondientes a hembras de *Ae. (Oc.) albifasciatus* capturadas en Paso Pache (Florida), en septiembre y diciembre de 2022 (Figura 21). En la Figura 20 se muestran los productos de amplificación de nsP4 de 195 pb de ambos *pooles* positivos.

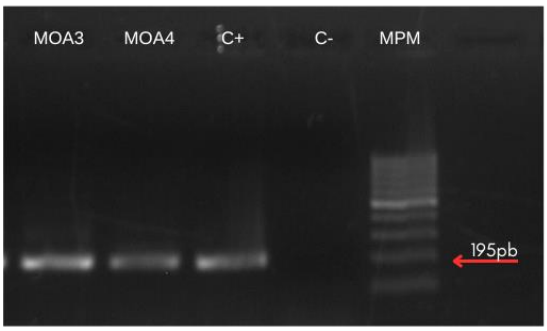


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Detección del gen nsP4 de alfavirus por RT-PCR anidada genérica (Sánchez-Seco et al., 2001) a partir de los *pooles* 10 y 12 de mosquitos. C+: control positivo; MOA3: *pool* 10; MOA4: *pool* 12; C-: control negativo; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler de 100pb DNA Ladder (Invitrogen ™).

Análisis de secuencias

La secuenciación de los productos de amplificación para MOA3 de 188 pb y para MOA4 de 183 pb del gen nsP4, comparada con la base de datos del GenBank reveló que compartían un alto grado de identidad de secuencia con RNV (complejo VEEV) informados previamente en mosquitos, roedores y murciélagos de Uruguay y Argentina (Tabla 16).

Por otro lado, se realizaron intentos de amplificación con las RT-PCR semi-anidadas genéricas y específica de RNV (mismos protocolos utilizados en murciélagos), sin embargo, no se obtuvo amplificación.

Tabla 16. Resultados de alfavirus en mosquitos. Se muestran especies de mosquitos, resultados y tamaños de secuencias, códigos y tipo de *pool*, sitios y años de recolección.

Especie	Resultado (Blastn)	Muestra	Localidad	Departamento	Año
Ae. (Oc.) albifasciatus	RNV 188 pb	MOA3/ H	Paso Pache	Florida	2022
Ae. (Oc.) albifasciatus	RNV 183 pb	MOA4/ H			

Figura 21. Mapas de Uruguay con las localidades donde se detectaron alfavirus en mosquitos y murciélagos. Mapa (A): localidades donde se detectaron murciélagos positivos para EEEV. **Mapa (B):** localidades donde se detectaron murciélagos positivos para RNV en mosquitos (▲) y murciélagos (•). A la izquierda se muestran la cantidad de muestras positivas por localidad.

Finalmente, las secuencias de amplificaciones anidadas y/o semi-anidadas provenientes de murciélagos y mosquitos (código de laboratorio INA* y MOA*, respectivamente) se compararon con 62 secuencias parciales y completas de alfavirus encefalíticos de diferentes complejos antigénicos (Tabla 2. ANEXO). El conjunto de datos incluyó además dos secuencias de mosquitos (MG009260 y MG009261) y nueve secuencias de murciélagos (MZ848197, MZ868633 - MZ868637, MZ890136 - MZ890138) obtenidas en estudios previos de nuestro grupo en Uruguay. Se utilizó una secuencia de MAYV como grupo externo.

La filogenia de máxima verosimilitud (Figura 22) mostró que las secuencias provenientes de los diferentes complejos antigénicos se agruparon de manera consistente, de acuerdo a lo reportado en la literatura, con un soporte significativo de aLRT. Las muestras obtenidas en este estudio se agruparon con secuencias de EEEV linaje I y RNV (complejo VEEV). Los códigos de muestra y las especies se indican en el árbol filogenético, junto con los números de acceso y los hospedadores de las secuencias descargadas de GenBank.

Dos secuencias provenientes de un *Myotis spp.* (INA29) capturado en la Usina Cuñapirú, Rivera en 2018, y de un *E. bonariensis* (INA52) capturado en Paso Pache, Florida en 2022, se agruparon dentro del clado EEEV linaje I con alto apoyo estadístico (aLRT= 1). Específicamente, INA29 se agrupó en un subclado con apoyo moderado (aLTR= 0.83) con las secuencias de EEEV reportadas previamente en *Myotis spp.* en la Usina Cuñapirú, colectadas en 2015 (MZ848197 y MZ868633). Por otro lado, INA52 se agrupó con alto soporte (aLRT= 1) junto a una secuencia obtenida de mosquitos *Cx. pipiens* recolectados en el departamento de Río Negro en 2006 (MG009260).

Por otra parte, 21 secuencias virales provenientes de murciélagos analizados en este estudio se agruparon con alto respaldo estadístico (aLRT= 1) dentro del clado de RNV. Ocho secuencias fueron recuperadas de *T. brasiliensis* capturados en Usina Cuñapirú, Rivera (INA18, 19, 22, 24, 35, 60 y 63) y La Unión, Montevideo (INA25), en 2018 y 2022. Seis fueron recuperadas de *Myotis spp.* de la Usina Cuñapirú (INA23, 26, 29, 57 y 58), Javier de Viana, Artigas (INA27) y Grutas de Salamanca, Maldonado (INA36), en 2018 y 2022. Tres correspondieron a *E. furinalis* de la Estancia El Molino, Soriano (INA20), Usina Cuñapirú (INA21), y Cerritos de Indios, Rocha (INA51), de 2018 y 2022. Por último, una secuencia corresponde a un *M. temminckii* de Estancia El Molino (INA28) de 2018; una a *M. molossus* del Camping Arequita, Lavalleja (INA59) de 2022; una a *E. montanus* de Los Matreros, Maldonado (INA37) de 2018; y una a *D. rotundus* en Usina Cuñapirú (DA1) de 2022. Además, las 2 secuencias provenientes de mosquitos *Ae. (Oc.) albifasciatus* capturados en Paso Pache, Florida (MOA3 y MOA4) en 2022, también se agruparon dentro del mismo clado.

Todas estas secuencias se encontraron en un grupo monofilético junto con diversas secuencias de RNV provenientes de roedores y mosquitos de diferentes localidades de Argentina. Este grupo también incluyó las secuencias obtenidas de *Myotis spp.* colectada en Artigas (MZ890136) tomada en 2013, las secuencias obtenidas de *T. brasiliensis* (MZ890137 y MZ890138) capturados en la Usina Cuñapirú en 2015, y la secuencia obtenida de mosquitos *Cx. pipiens* (MG009261) colectados en 2014 en Las Toscas, Canelones.

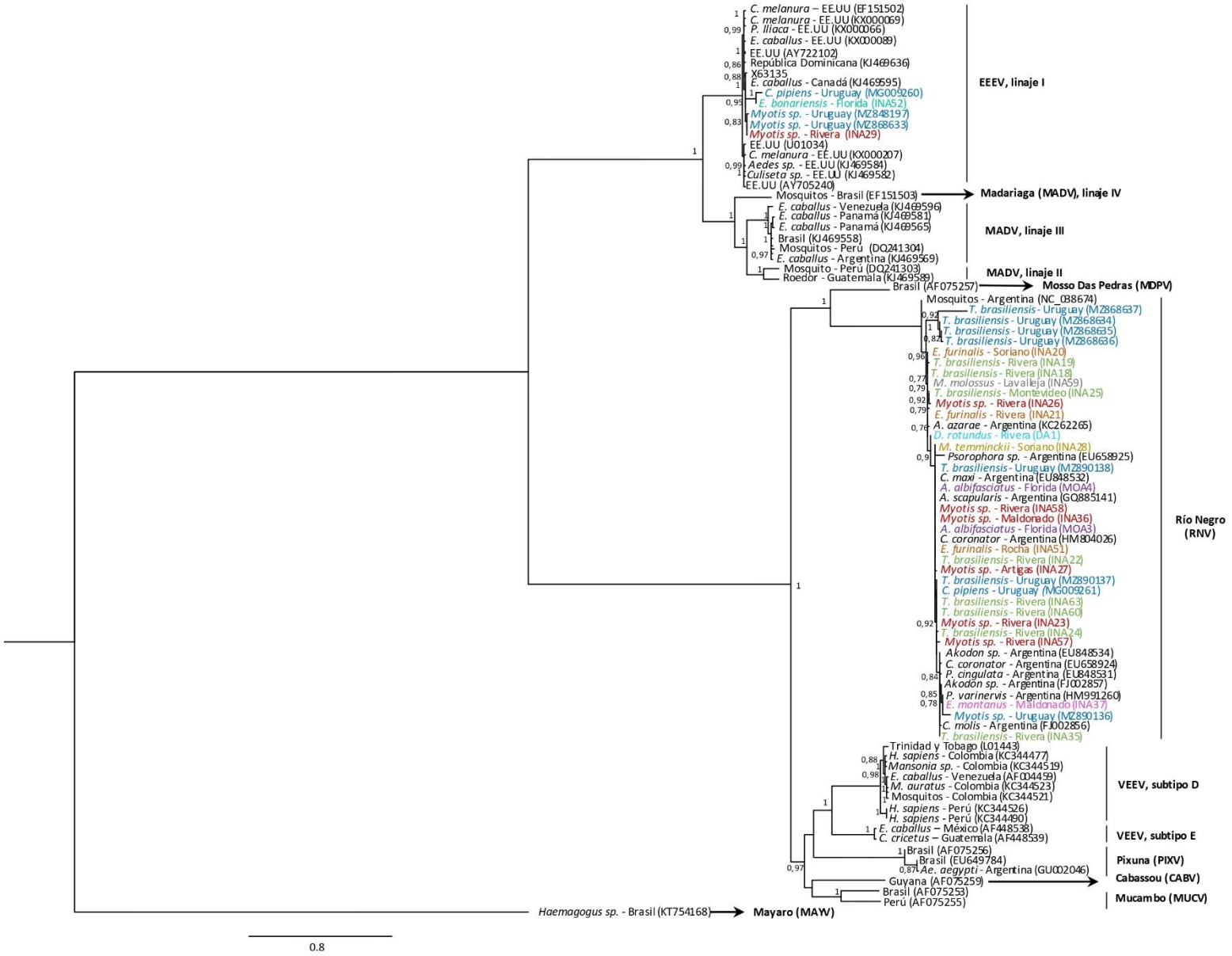


Figura 22. **Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias parciales de nsP4 de la familia *Togaviridae*, género Alfavirus.** El análisis se realizó en base a setenta y dos secuencias de alfavirus provenientes de diferentes vertebrados y mosquitos obtenidas de GenBank, incluidas las secuencias de mosquitos y murciélagos informadas anteriormente en Uruguay (azul). La filogenia se reconstruyó bajo el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. Los soportes de clados se estimaron a través de la prueba de razón de verosimilitud aproximada (aLRT), y solo se muestran los que están por encima de 0,75. Se utilizó una secuencia de virus Mayaro como grupo externo. Las especies y las localidades de captura de los 23 alfavirus detectados en este trabajo se representan como INA* (murciélagos) y MOA* (mosquitos) y en color: virus encontrados en murciélagos *T. brasiliensis*: verde; *Myotis spp.*: rojo; *E. furinalis*: naranja; *M. temminckii*: amarillo; *M. molossus*: gris; *D. rotundus*: celeste; *E. montanus*: rosado; *E. bonariensis*: verde agua; y en mosquitos *Ae. (Oc.) albifasciatus:* violeta. Alineamiento en base a secuencias parciales y completas (11704pb).

Puesta a punto de titulación de alfavirus en cultivo celular

Se propagó una cepa de RNV en células Vero para generar stock viral. A las 72h post-infección se observó el ECP, que consta de células redondeadas agrupadas y desprendidas del sustrato, en comparación con el crecimiento confluente del cultivo sin infectar (Figura 23).

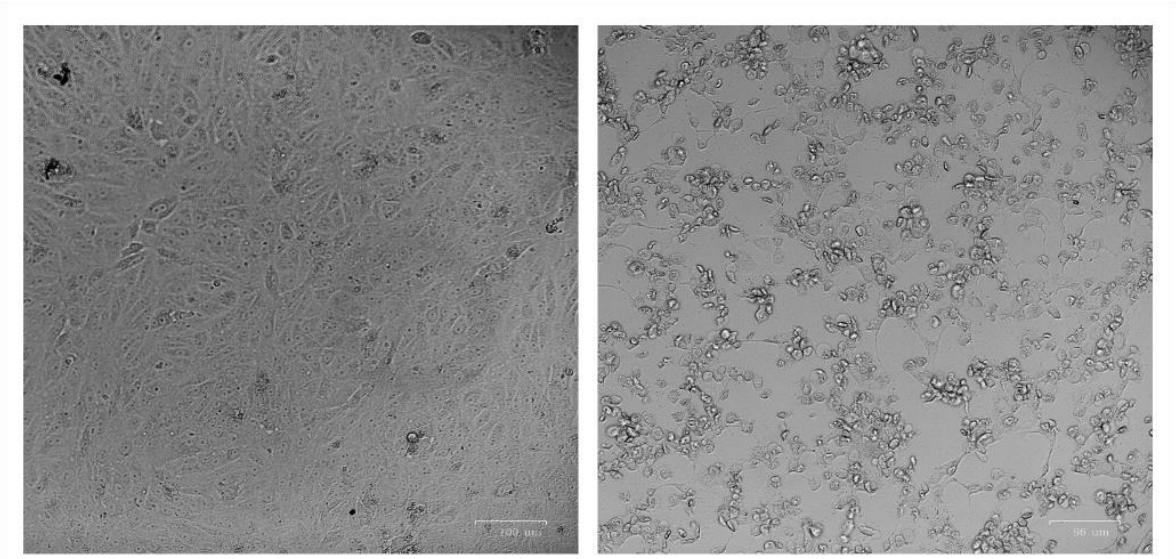


Figura 23. **Infección de células Vero con virus Río Negro.** Izquierda: control celular sin infectar. Derecha: 72h post infección, se pueden observar las células redondeadas agrupadas y desprendidas del sustrato.

Además, la infección se confirmó por métodos moleculares mediante extracción de ARN total procedente del cultivo y RT-PCR anidada genérica para alfavirus. En la Figura 24 se muestra el producto de amplificación del gen nsP4 de 195 pb de RNV.

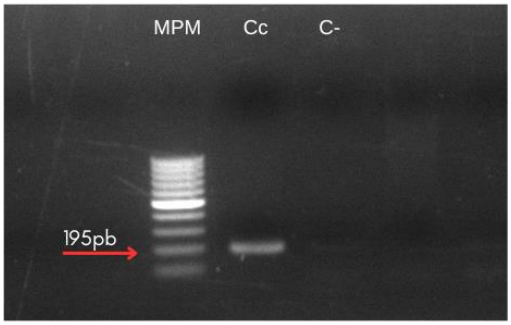


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. Detección del gen nsP4 de alfavirus por RT-PCR anidada genérica (Sánchez-Seco et al., 2001) a partir del extracto obtenido de la infección en células Vero E6. Cc: extracto de cultivo infectado; C-: control negativo; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen ™).

Se llevaron a cabo varios ensayos con el objetivo de obtener el título por plaqueo viral, utilizando diferentes condiciones en el protocolo. Sin embargo, no se obtuvo formación de placas en ninguno de los ensayos y las células en el control negativo se vieron afectadas, lo que llevó a descartar dicho protocolo (Figura 25A). Por lo tanto, se procedió a realizar la puesta a punto de la técnica de titulación TCID50% utilizando el stock generado de RNV.

El ensayo por TCID50% se realizó en una sola réplica empleando una placa M96 de células Vero, donde a las 72h post infección se visualizó al microscopio óptico los pocillos con ECP (Figura 25B). El título fue establecido mediante el cálculo estadístico de Reed y Muench en **$10^{7,5}$ TCID50/mL** en un tiempo de 3 días de infección. Debido a que el valor obtenido por este método es diferente al obtenido en el ensayo de placas, comúnmente utilizada para la titulación de RNV, el mismo corresponde estadísticamente a **~2,2 x 10^{7} UFP/mL**, ya que 1 unidad TCID50/mL equivale a ~0.7 UFP/mL (ATCC, 2013).

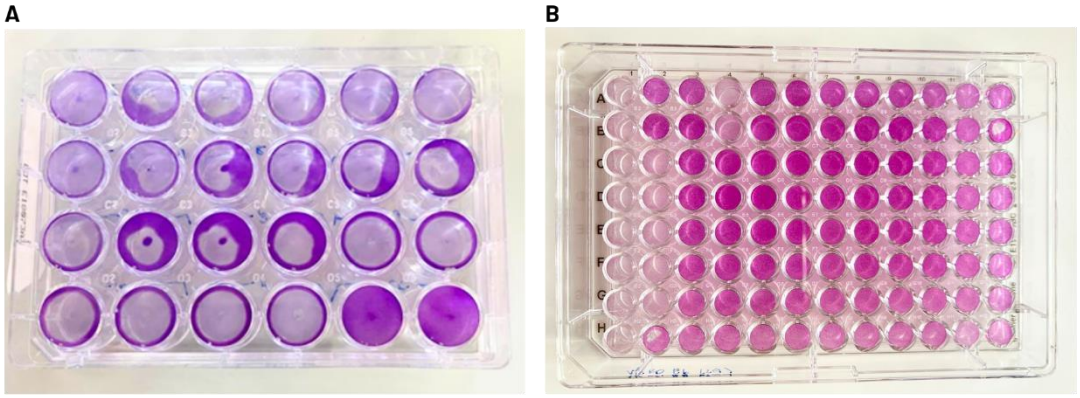


Figura 25. Ensayos de titulación por plaqueo viral y TCID50%. A) No se observan placas individuales en ninguno de los ensayos realizados. **B)** Se observó ECP al microscopio óptico en las dos primeras columnas (diluciones 10^{-5} y 10^{-6}). Los pocillos donde no se observa color luego de la 2da columna son producto del desprendimiento de la monocapa al fijarse con solución de fijación y teñirse con cristal violeta.

5 Discusión

En este estudio se analizaron un total de 329 muestras de hisopados orales (n= 292) y anales (n= 37) de individuos de 12 especies de murciélagos autóctonos colectados en 12 departamentos de Uruguay (Artigas, Canelones, Cerro Largo, Florida, Lavalleja, Maldonado, Montevideo, Río Negro, Rivera, Rocha, Soriano y Treinta y Tres) entre los años 2017 y 2022, para conocer los virus que pueden albergar. En el análisis las muestras fueron divididas en: ***muestras de archivo*** de ***insectívoros*** (n= 124) y ***hematófagos*** (n= 133), tomadas entre los años 2017 y 2019, y ***muestras nuevas*** (n= 72), tomadas durante el año 2022.

De los resultados del estudio de coronavirus en murciélagos

En las últimas décadas, el interés a nivel mundial por la detección de CoV en murciélagos ha ido en aumento. En Latinoamérica, estudios recientes han identificado nuevos CoV en México y Brasil, en murciélagos insectívoros de 4 especies que también habitan en Uruguay: *T. brasiliensis, M. molossus, M. rufus* y *Myotis spp.* (Góes et al., 2013; Lima et al., 2013; Lucero Arteaga et al., 2023; Simas et al., 2015). Sin embargo, hasta el momento, en Uruguay no se disponía de información sobre la presencia de CoV en estos mamíferos. Por esta razón, el presente estudio se enfoca en el análisis de muestras de murciélagos ya existentes en el laboratorio, así como en la recolección de nuevas muestras, con el objetivo de buscar la presencia de estos virus con el potencial de infectar a los murciélagos en nuestro país.

Para la detección molecular de CoV se probaron diferentes protocolos disponibles en la bibliografía que utilizan cebadores degenerados con el potencial de detectar la gran diversidad de los CoV. De los cuatro protocolos probados, el protocolo publicado en Anthony et al., (2015), fue el que dio los mejores resultados, por lo cual se utilizó para analizar el total de las muestras de archivo y nuevas (n= 329). Se obtuvo así la primera detección molecular de un AlfaCoV asociado a murciélagos (BatCoV), para nuestro país, a partir de un hisopado oral de un murciélago insectívoro capturado en el departamento de Río Negro, en 2019. El sitio de captura fue dentro del AICOM "Palmares de Caranday", un ecosistema amenazado formado por la palmera *Trithrinax campestris*, ubicado en el Litoral Sur-Oeste de Uruguay. La secuencia parcial obtenida del gen RdRp, identificada como LMC122, mostró un alto grado de similitud con otras variantes detectadas en murciélagos de la misma especie de Brasil y Argentina con un 96% de identidad de secuencia en ambos casos (KX094984, OP169153). La secuencia LMC122 fue recuperada de un murciélago insectívoro *M. molossus* (familia Molossidae) conocido como murciélago mastín común (Pallas, 1766). Presenta una amplia distribución en el Viejo y Nuevo Mundo, a lo largo de toda América y en nuestro país se encuentra en todo el territorio, habitando desde huecos de árboles, edificaciones abandonadas, techos y hojas de palma (Romero, Vallejo & Boada, 2022).

Como era de esperarse, el análisis filogenético basado en la región genómica de RdRp muestra que las secuencias de CoV incluidas en el análisis se agrupan según el género/especie del hospedador. Según Caraballo et al., (2022) en América se han identificado 7 linajes diferentes de Alfa-BatCoV que circulan entre los murciélagos. Estos linajes son mantenidos por miembros de las

familias Phyllostomidae, Vespertillionidae y Molossidae. De los 7 linajes, 3 son compartidos por murciélagos de las familias Vespertillionidae y Molossidae, las cuales están estrechamente relacionadas (Agnarsson et al., 2011; Anthony et al., 2013; Teeling et al., 2005). Específicamente, se ha observado que 2 linajes de Alfa-BatCoV co-circulan entre los géneros *Molossus* y *Tadarida* de la familia Molossidae, los cuales suelen compartir refugios. Además, se ha identificado al género *Myotis* de la familia Vespertillionidae como el posible hospedador ancestral y el principal reservorio evolutivo de AlfaCoV en las Américas (Caraballo et al., 2022). En el árbol filogenético analizado, dentro del grupo monofilético que incluye a LMC122, además de las secuencias más cercanas de *M. molossus,* se agruparon otras secuencias similares, provenientes de murciélagos de las especies *Molossus rufus, Tadarida brasiliensis y Myotis sp*. con un alto soporte estadístico (aLRT= 0.99). Este agrupamiento se puede explicar por las relaciones cercanas entre estos géneros de murciélagos y los CoV que albergan, y son concordantes con la hipótesis de que los CoV co-evolucionan con especies o géneros específicos de murciélagos, como han sugerido otros estudios previos realizados (Moreira-Soto et al., 2015). Para observar si esta relación virus-hospedador específico se mantiene, es necesario continuar estos estudios, incluyendo regiones más amplias y filogenéticamente informativas.

Con respecto al número de muestras analizadas, se obtuvo un porcentaje bajo de positivos (0.3%), no obstante, la prevalencia obtenida para hisopados orales está dentro de lo esperado. Esto destaca la importancia del esfuerzo de muestreo realizado en este estudio, ya que, según Anthony et al., (2017), para lograr detectar 1 CoV es necesario analizar al menos 154 individuos de cada especie, y en este estudio se analizaron un total de 329 muestras de 12 especies diferentes de murciélagos. Igualmente, la prevalencia puede estar subestimada ya que el mayor porcentaje de CoV en murciélagos a nivel global ha sido detectado casi exclusivamente a partir de muestras anales/fecas, evidenciando un mayor tropismo intestinal, donde la probabilidad de detectar CoV en América Latina a partir de muestras de fecas es hasta 16 veces más probable, y en hisopados anales 28 veces más probables con respecto a los hisopados orales (Anthony et al., 2017; Hernández-Aguilar et al., 2021; Tang et al., 2006). En este estudio las muestras anales fueron solo un 11% de las muestras totales debido a que este tipo de muestras se comenzó a implementar a partir de las nuevas capturas de 2022. En estudios posteriores será necesario ampliar el análisis de muestras anales/fecas. Según otros estudios, los AlfaCoV son los más frecuentemente encontrados en América del Sur, pero también se han detectado BetaCoV en murciélagos Sudamericanos. Entre estos, se encuentran los vampiros *D. rotundus*, los cuales fueron incluidos en este estudio con 143 muestras (hisopado oral= 138, anal= 5), pero no se detectaron BetaCoV en ellos (Anthony et al., 2013; Bittar et al., 2020; Lucero Arteaga et al., 2023; Moreira-Soto et al., 2015). En concordancia con lo antes mencionado, y debido a la pequeña cantidad de muestras recolectadas de hisopados anales/fecas, no se puede descartar la presencia de BetaCoV en murciélagos de Uruguay hasta analizar un mayor número de este tipo de muestras.

Con respecto a los otros tres protocolos de RT-PCR probados para detectar panCoV fueron descartados debido a que no se obtuvo los tamaños de amplicón esperados con el control positivo (Chu et al., 2011), o se obtuvo resultados poco claros con bandas de tamaño no específico, y no detectaron CoV en las muestras analizadas, incluyendo LMC122 (Vijgen et al., 2008; Quan et al., 2010). Estos resultados pueden atribuirse a que los cebadores se basaron en secuencias de CoV

principalmente hallados en el Viejo Mundo, lo que podría sesgar la detección de los Bat-CoV Sudamericanos. En el futuro, sería valioso probar otros protocolos de RT-PCR recientemente utilizados en murciélagos de la región, como en Argentina (Lucero Arteaga et al., 2023), y considerar secuenciar completamente LMC122 para diseñar cebadores más representativos.

A nivel mundial, se ha observado un claro sesgo en el muestreo de murciélagos, tanto en términos geográficos como taxonómicos, con una mayor concentración de estudios realizados en China. En el continente americano se han detectado CoV en 11 países, con la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo en Brasil y Argentina. Estos hallazgos han ampliado nuestro conocimiento sobre la distribución geográfica de estos virus en Sudamérica. La posible conexión zoonótica de la pandemia de COVID-19 destaca la importancia de las infecciones en la fauna silvestre y resalta la relevancia de cómo los humanos interactúan y manejan esta fauna, ya que estas interacciones pueden facilitar el salto de patógenos entre diferentes especies (Plowright et al., 2017, 2021).

De los resultados de alfavirus en murciélagos, mosquitos y titulación viral

Los alfavirus se mantienen en la naturaleza a través de ciclos de transmisión entre los vectores artrópodos hematófagos y hospedadores vertebrados susceptibles. Se ha reportado el aislamiento y presencia de anticuerpos y genoma de varios arbovirus, incluidos los alfavirus, en murciélagos (revisado por Moratelli & Calisher, 2015; Luis et al., 2013). Sin embargo, la información aún es escasa, especialmente en especies autóctonas de América del Sur y su rol como hospedadores y/o amplificadores es discutido. En estudios previos, hemos detectado la presencia genómica de dos alfavirus diferentes en dos especies autóctonas de murciélagos del norte de nuestro país. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue ampliar nuestro conocimiento sobre el papel de estos mamíferos en los ciclos virales naturales. Para esto nos enfocamos en el análisis de muestras de murciélagos ya existentes en nuestro laboratorio, así como en la recolección de nuevas muestras, junto con colecta de mosquitos presentes en los alrededores de las colonias estudiadas.

Para los ensayos de alfavirus se analizaron las muestras de archivo de murciélagos insectívoros y todas las muestras nuevas (n= 196) utilizando un conjunto de cebadores altamente degenerados y genéricos, potencialmente capaces de detectar la diversidad viral del género alfavirus (Sánchez-Seco et al., 2001). Este estudio ha contribuido a mejorar nuestro conocimiento sobre la presencia de RNV y EEEV en murciélagos de nuestro país y su distribución geográfica. Los resultados revelaron la detección del genoma de estos virus en individuos de 8 de las 12 especies de murciélagos analizadas, incluyendo *T. brasiliensis, M. temminckii, M. molossus, E. bonariensis, Myotis spp., E. montanus, E. furinalis y D. rotundus*. En un estudio previo, nuestro grupo identificó estos alfavirus mediante análisis moleculares en murciélagos insectívoros (*T. brasiliensis y Myotis spp.*) capturados en 2013 y 2015 al norte de Uruguay (Moreira Marrero et al., 2022). Los resultados actuales junto con los anteriores, sugieren que estos virus han estado circulando en estas poblaciones de murciélagos durante casi 10 años. Además, este estudio ha ampliado la distribución geográfica de los virus a nuevas regiones del país, incluyendo la región Metropolitana, Centro, Este

y Litoral Oeste, en los departamentos de Montevideo (barrio La Unión), Florida (Paso Pache), Maldonado (Grutas de Salamanca y Estancia Los Matreros), Lavalleja (camping del Cerro Arequita), Rocha (Cerritos de Indios) y Soriano (Estancia El Molino). También se han reportado nuevamente en el norte, en Artigas y Rivera, aunque se han identificado nuevos puntos dentro de estos departamentos (Javier de Viana y Cerro Cuñapirú).

Un hallazgo adicional e interesante es la identificación de 2 *pooles* de mosquitos *Ae. (Oc.) albifasciatus* que dieron positivo para RNV, colectados en la localidad de Paso Pache en las cercanías de una colonia de murciélagos ubicada en un antiguo puente cerca del Río Santa Lucía (Florida). Estos mosquitos fueron capturados en dos ocasiones, una en primavera y otra en verano de 2022. Aunque no se detectaron murciélagos positivos para RNV en las capturas realizadas hasta el momento en esta localidad, todavía queda un conjunto de muestras de hisopados orales y anales colectadas en las mismas fechas pendientes de ser procesadas. Estos resultados se suman a investigaciones previas donde se reportó un alto porcentaje de seroprevalencia en equinos por diversos alfavirus, incluyendo el complejo VEEV y EEEV, en el departamento de Florida (Burgueño et al., 2018). Este reporte representa un hallazgo significativo, ya que se suma una nueva especie de mosquitos donde se ha detectado RNV en nuestro país. Anteriormente, la presencia del virus se había detectado en mosquitos del género *Culex* (Burgueño et al., 2018). Esta nueva detección amplía nuestra comprensión sobre la diversidad de mosquitos que podrían actuar como vectores del RNV en la región, lo que es relevante para fortalecer los esfuerzos de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por mosquitos en el país.

La filogenia obtenida refuerza que, a pesar de la corta secuencia analizada, existe suficiente información filogenética para asignar virus a los distintos complejos y sus especies. Con respecto al clado de los murciélagos y mosquitos RNV positivos, las secuencias muestran una gran similitud con RNV de la región identificados en mosquitos y roedores. No se evidencia gran divergencia ni señal filogenética o geográfica al analizar la topología del árbol entre las muestras de diferentes localidades de Uruguay y Argentina, ni entre murciélagos insectívoros y hematófagos, y tampoco considerando los mosquitos de Argentina. Solamente un subclado diverge del resto, que corresponde a las cuatro secuencias previamente identificadas en individuos de *T. brasiliensis* de la Usina Cuñapirú, de 2015 (MZ868634-37), lo que indica que podrían haber estado circulando diferentes variantes de RNV en nuestro país, incluso en la misma colonia. Nuevos análisis basados en regiones genómicas más amplias y filogenéticamente informativas nos permitirán ahondar en las relaciones evolutivas dentro de este grupo.

Los RNV obtenidos se recuperaron de diferentes puntos del territorio uruguayo lo que podría indicar que hubo varios focos de actividad viral en diferentes poblaciones de murciélagos del país. Al igual que lo reportó Burgueño et al., (2018) RNV es la especie de alfavirus con mayor distribución geográfica en el país y la mayoría de los individuos positivos provienen de Rivera (n= 13), principalmente de la Usina Cuñapirú (n= 12) recuperados nuevamente en individuos de las especies *T. brasiliensis* (n= 7, INA18, 19, 22, 24, 35, 60, 63) y *Myotis spp.* (n= 4, INA23, 26, 57, 58). Estos murciélagos corresponden a una colonia maternal mixta que dormita en los túneles de una represa abandonada y planta procesadora de minerales (Botto Nuñez et al. 2018; Genta et al. 2017). En el presente estudio detectamos por primera vez en nuestro país a RNV en un ejemplar del vampiro común (*D. rotundus*) (DA1) correspondiente a una colonia que habita en túneles contiguos, pero sin contacto, con la colonia mencionada anteriormente. Adicionalmente, se detectó también

por primera vez un RNV en un individuo de *E. furinalis* (INA21) capturado en un bosque nativo del Cerro Cuñapirú, aproximadamente a 3 km de la Usina Cuñapirú.

Es importante resaltar que Rivera fue reportado como uno de los departamentos con mayor seroprevalencia en equinos para alfavirus (Burgueño et al., 2018). Estos resultados resaltan la importancia de seguir investigando la presencia y distribución de RNV, y los posibles ciclos de transmisión entre mosquitos y murciélagos u otros hospedadores vertebrados susceptibles como equinos y roedores, estos últimos identificados en la literatura como hospedadores amplificadores. En particular, es de destacar el hallazgo de RNV en un murciélago hematófago, ya que, en nuestro país, el virus había sido detectado únicamente en murciélagos insectívoros.

Hasta el momento no se han reportado epizootias ni casos humanos atribuibles a virus del complejo VEE en Uruguay, lo que podría deberse a diferentes factores como la circulación de variantes con baja virulencia, la distribución de los reservorios potenciales, o simplemente a causa de un subdiagnóstico (Hoyos-López et al., 2016). Los potenciales vectores *Cx. pipiens*/*quinquefasciatus* y *Ae. (Oc.) albifasciatus* se encuentran ampliamente distribuidos en Uruguay, los cuales en este trabajo fueron los mayormente capturados. Estos datos junto con las altas concentraciones de hospedadores vertebrados potenciales podrían favorecer, en un futuro, los saltos a hospedadores alternativos o la infección en mosquitos con diferente competencia vectorial (Hoyos-López et al., 2016). En particular, RNV es considerado un virus enzoótico que tiende a ser avirulento para los equinos y generalmente provoca viremia de bajo nivel y poca o ninguna enfermedad en humanos. En Argentina, se han llevado a cabo estudios seroepidemiológicos en pacientes con síndrome febril y síntomas compatibles con el virus del dengue. En estos estudios, se detectaron anticuerpos neutralizantes específicos para el RNV (Cámara et al., 2003; Contigiani et al., 1993; Pisano et al., 2010). El reciente reporte sobre la identificación de RNV en un trabajador rural en Bolivia, a través de análisis genómicos, surge a raíz de un caso clínico que presentó síndrome febril. Las pruebas iniciales para el SARS-CoV-2 y hantavirus resultaron negativas, este hallazgo remarca la importancia del diagnóstico diferencial con otros virus con similar sintomatología (Loayza Mafayle et al., 2023). En Uruguay, resultaría fundamental realizar estudios serológicos y/o moleculares para identificar infecciones en humanos que puedan estar pasando subdiagnosticadas dentro de los síndromes febriles. Los estudios de seroprevalencia permitirían detectar la presencia de anticuerpos específicos en la población, lo que puede revelar la exposición previa a estos alfavirus, sea que hayan sido infecciones leves o asintomáticas.

Por otra parte, se obtuvo dos muestras positivas para el virus EEEV, nuevamente en murciélagos de la especie *Myotis spp.* y, por primera vez en un individuo de la especie *E. bonariensis*, este último obtenido de un hisopado anal. De acuerdo con el análisis filogenético, estas muestras se agruparon en un clado bien sustentado junto con secuencias provenientes del linaje I de Norteamérica. La muestra de *Myotis spp.* colectada en la Usina Cuñapirú mostró una estrecha relación con dos secuencias recuperadas previamente de *Myotis spp.* colectadas en la misma colonia en el año 2015 (MZ848197 y MZ868633), esta relación genética entre muestras separadas en el tiempo podría indicar una posible persistencia del virus en esta población de murciélagos. Es interesante que los murciélagos que dieron positivo para EEEV y RNV en *T. brasiliensis* y *Myotis spp.* en la Usina Cuñapirú en 2018 fueron colectados en el mismo refugio durante la misma captura. Esto refuerza la posibilidad de que coexistan dos ciclos independientes de transmisión viral en diferentes especies de murciélagos que comparten el mismo refugio (Moreira Marrero et al., 2022), lo que

enfatiza la complejidad de las interacciones entre los murciélagos y los virus en un ecosistema. La secuencia de EEEV obtenida de un murciélago de la especie *E. bonariensis*, colectado en Paso Pache (Florida) en 2022, mostró una estrecha relación con una secuencia obtenida de mosquitos *Cx. pipiens* de Fray Bentos (departamento de Río Negro) en 2006 (MG009260).

Si bien el linaje I de EEEV se considera limitado a ciclos enzoóticos y epizootias en humanos y equinos en la costa este de América del Norte, el Caribe y América Central Oriental (Arrigo et al., 2010; CDC, 2023), es probable que haya ocurrido una introducción y circulación silenciosa de este linaje en nuestro país (Moreira Marrero et al., 2022). Los alfavirus neurotrópicos que circulan en la región presentan un menor potencial de reemergencia con respecto a otros alfavirus como CHIKV, sin embargo, especialmente EEEV tiene el potencial de causar episodios epizoóticos o epidémicos graves en humanos y animales, como equinos (OPS, 2022). Por lo tanto, el hallazgo previo de estos virus en mosquitos, la presencia de anticuerpos en equinos y el descubrimiento actual en murciélagos, en conjunto son datos importantes y merecen una investigación más exhaustiva (Burgueño et al., 2018; Moreira Marrero et al., 2022).

Es importante señalar la diferencia entre la diversidad de especies de murciélagos positivos para ambos virus. En el caso de RNV se ha detectado en murciélagos pertenecientes a un mayor número de especies (n= 7), lo que sugiere que podría tener un rango de hospedadores más amplio. En cuanto a EEEV, parece estar principalmente asociado con murciélagos del género *Myotis spp.,* sin embargo, la detección por primera vez en *E. bonariesis* representa un nuevo aspecto en la ecología viral de EEEV en nuestro país. Para profundizar en esto, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR anidadas para genes que son más variables y podrían proporcionar información filogenética más relevante para ambas especies virales, el gen nsP1 para EEEV y el gen PE2 para RNV (De Morais Bronzoni et al., 2005; Pisano et al., 2014). Además, para RNV estos genes son amplificados porque pueden contener determinantes importantes de la virulencia equina y el potencial de amplificación que determina el fenotipo de la cepa de los virus del complejo VEEV (Pisano et al., 2014). Sin embargo, no se logró la amplificación en ninguno de los 23 casos positivos para murciélagos analizados. Esta falta de éxito podría deberse a problemas de sensibilidad en los ensayos. En particular, Pisano et al. (2014) reportan que lograron la amplificación en las muestras que provenían de aislamientos en cultivos celulares. Por lo tanto, en investigaciones futuras, será esencial intentar el aislamiento viral a partir de mosquitos o muestras de murciélagos para luego realizar estos ensayos o incluso para obtener secuencias completas mediante la secuenciación de próxima generación (NGS), a fin de dilucidar en mayor profundidad las relaciones filogenéticas y la ecología de estos virus en Uruguay.

Por otra parte, es necesario aclarar que la detección genómica en hisopados orales y anales no proporciona pruebas suficientes para establecer a los murciélagos como reservorios de alfavirus, ni define su rol en los ciclos enzoóticos. Esto se debe a que la presencia del ácido nucleico del virus en este tipo de muestras no es una prueba concluyente de la relación entre el virus y la infección del hospedador, o la enfermedad que podría causar. Se podría especular que el genoma viral haya estado presente en los alimentos consumidos por los murciélagos, como los mosquitos, ya que la mayoría de las muestras recolectadas fueron de murciélagos insectívoros (Barrantes Murillo et al., 2022; Moratelli & Calisher, 2015). Sin embargo, la evidencia de detección viral en la saliva de un murciélago hematófago respalda la hipótesis de que la presencia del virus no es simplemente el resultado de la ingestión de insectos. Resulta interesante que el vampiro común, a partir del cual

fue detectado RNV, pertenece a una colonia simpátrica a la colonia mixta de murciélagos insectívoros de la Usina Cuñapirú. En todo caso, el estilo de vida gregario de estos murciélagos, que pasan la mayor parte del tiempo inmóviles en colonias los convierte en "objetivos perfectos" para ser picados por mosquitos y otros artrópodos vectores de arbovirus (Moratelli & Calisher, 2015). Será necesario ampliar la captura de mosquitos en los alrededores de estas colonias, ya que se logró colectar ejemplares solamente del género *Culex sp.,* y en un número bajo para la estación estival. En estas capturas no se utilizó Octenol, un aditivo que se implementó en capturas posteriores y que resultó efectivo para la captura de mosquitos en Paso Pache (Florida).

Es importante destacar que independientemente de si el genoma viral presente en saliva y fecas proviene de los mosquitos de los cuales se alimentan, los murciélagos están desempeñando un importante papel ecológico al reducir la carga viral en el ambiente. Se estima que especies como *M. lucifugus* pueden consumir entre 4 y 8g de insectos por noche durante la temporada activa (Boyles et al., 2011) y que una hembra de *T. brasiliensis* lactante, con un peso aproximado de 12.5g podría consumir alrededor de 8 g de insectos por noche (Cleveland et al., 2006). Estos datos proporcionan evidencia a favor de la conservación de los murciélagos, además de que la eliminación o reducción de colonias para evitar el riesgo de diseminación viral no está comprobada que resulte efectiva, por el contrario, podría resultar contraproducente (Amman et al., 2014; Streicker et al., 2012).

El enfoque utilizado en este trabajo tiene la ventaja adicional de permitir el seguimiento a largo plazo de las poblaciones de murciélagos, ya que los individuos son devueltos a sus refugios anillados con número identificatorio para su posterior recaptura e identificación individual, lo que permitirá inferencias más sólidas sobre la dinámica viral a largo plazo (Gamble et al., 2020; Moreira Marrero et al., 2021). Estos resultados confirman que los murciélagos pueden ser infectados por los alfavirus RNV y EEEV, sin embargo, la evidencia para asignarlos como hospedadores amplificadores o finales aún es escasa (Kuno et al., 2017). Será importante seguir estudiando algunos aspectos de la ecología de los alfavirus en Uruguay, como la diversidad de posibles reservorios, incluidas aves, roedores y murciélagos, así como la presencia de anticuerpos neutralizantes en los quirópteros. Además, será relevante detectar la presencia de mosquitos positivos a los virus mencionados que coincidan con la viremia en murciélagos junto con el análisis de la comida sanguínea en mosquitos hembras para confirmar si efectivamente se alimentan de los murciélagos. Este análisis está planteado a futuro y se realizará mediante un protocolo de PCR que utiliza cebadores diseñados para amplificar fragmentos de la región de "código de barras" del gen COI de los vertebrados (Reeves et al., 2018).

Por último, con el fin de desarrollar futuros protocolos de detección de anticuerpos neutralizantes contra los virus RNV y EEEV presentes en sueros de murciélagos, se implementó un ensayo de titulación basado en el cultivo de tejidos con el método de dosis infecciosa 50% (TCID50%) por observación del efecto citopático. Se utilizó el control de RNV proveniente de un aislado de mosquitos y se obtuvo un título de $10^{7,5}$ TCID50/mL en un tiempo de 3 días de infección. Aunque se requiere confirmar este título con un número adecuado de réplicas (al menos tres), este método de titulación permitió establecer un protocolo alternativo para la búsqueda de anticuerpos neutralizantes que podría resultar apropiado para los virus analizados. La prueba estándar por plaqueo viral es la comúnmente utilizada en la región, al igual que la prueba PRNT (prueba de neutralización por reducción de placas) considerada el ensayo de referencia para la detección

serológica de infecciones arbovirales (OPS, 2022). A pesar de los múltiples intentos realizados en el presente estudio para realizar el plaqueo viral, no fue posible obtener placas individuales utilizando diferentes condiciones de prueba. Esto pudo deberse a diversas razones, como la calidad de los reactivos utilizados o las características específicas de la línea celular utilizada en el ensayo. El hecho de que el control negativo también se viera afectado sugiere que pudo haber algún problema en el procedimiento experimental que afectó el desarrollo de la técnica.

A pesar de las dificultades en el plaqueo viral mencionadas anteriormente, se logró desarrollar un protocolo de titulación por TCID50%, el cual es un método especialmente útil cuando no se pueden obtener placas y proporciona una alternativa para evaluar la cantidad de virus presente en el aislado de RNV. De acuerdo a la bibliografía estos métodos podrían tener igual validez para la titulación de virus del complejo VEEV (Batalla et al., 1972), incluso para otros alfavirus como CHIKV y ONNV (Abdoullah et al., 2023; Hozé et al., 2021). El valor obtenido es diferente al obtenido en el ensayo de formación de placas, pero según análisis estadísticos se ha establecido una equivalencia de 1 unidad TCID50% corresponde a ~0.7 UFP, por lo que el título podría expresarse como 2.2 x 10^7 UFP/mL (ATCC, 2013). Si bien estos ensayos requieren mayor profundización, constituyen un punto inicial para los análisis serológicos de RNV y EEEV en murciélagos.

En su conjunto, los resultados de las investigaciones presentadas en esta tesis representan una valiosa contribución al conocimiento de la circulación de coronavirus y alfavirus en el país. La elucidación de los patrones de transmisión y dispersión enzoótica de patógenos zoonóticos, acompañada de un diseño de campo que tome en cuenta los factores bióticos y abióticos que puedan afectar a las poblaciones de murciélagos y otros vertebrados involucrados (como la perturbación del hábitat), resultará fundamental para comprender y predecir el riesgo para la salud humana.

6 Conclusiones

A continuación, se exponen las conclusiones específicas de la investigación, articuladas en torno a los capítulos de la presente tesis de maestría.

1. Durante el 2022 como parte de las salidas de campo del presente trabajo se colectaron un total de 72 muestras nuevas, correspondientes a hisopados orales y se implementaron los hisopados anales, además de obtener muestras de sangre para futuros ensayos serológicos.

2. Junto con las muestras de archivo presentes en la Sección Virología, se obtuvo un total de 329 muestras de hisopados orales y anales de individuos de 12 especies de murciélagos autóctonos en 12 departamentos de Uruguay, estableciendo un marco de análisis de 5 años, desde 2017 a 2022.

3. Se logró poner a punto una RT con *random primers* a fin de obtener ADNc que pueda ser utilizado en el *screening* de diferentes familias virales con genoma ARN.

4. Se puso a punto una PCR anidada contra una región conservada de la ARN polimerasa de los coronavirus que permite identificar y caracterizar a nivel de género entre Alfa-, Beta-, Gamma- y DeltaCoV.

5. En el presente trabajo se detectó y caracterizó por primera vez en Uruguay un AlfaCoV asociado a murciélagos *M. molossus*. Esta identificación se realizó a partir de una muestra de hisopado oral en un ejemplar capturado en el departamento de Río Negro en 2019.

6. Se logró el objetivo de profundizar en la detección y caracterización de los alfavirus RNV y EEEV en nuevas especies de murciélagos y nuevas localidades, a partir de hisopados orales, y por primera vez en hisopados anales.

7. RNV exhibió la mayor prevalencia en murciélagos, una amplia distribución geográfica y el genoma viral se detectó por primera vez en mosquitos *Ae. (Oc.) albifasciatus* colectados en dos meses distintos del año 2022 en Paso Pache (Florida). Dichos mosquitos fueron capturados en las inmediaciones de las colonias de murciélagos.

8. Para ambas familias virales nos centramos en el análisis de fragmentos relativamente cortos del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN. A pesar de esta limitación, esta metodología fue suficiente para identificar y descubrir estas nuevas variantes, lo que cumplió con nuestro objetivo principal.

9. Las muestras a partir de hisopados demostraron nuevamente ser una alternativa eficaz para la obtención de ácidos nucleicos para realizar *screening* viral, con un manejo fácil y poco invasivo para los animales.

10. Se logró poner a punto un protocolo de titulación de virus Río Negro a partir del ensayo de TCID50% mediante observación del efecto citopático. La técnica podrá ser utilizada para la búsqueda de anticuerpos neutralizantes para alfavirus en murciélagos.

11. El trabajo multidisciplinario que combina los estudios virológicos con el trabajo de campo y conservación, son necesarios para una vigilancia continua de patógenos conocidos y nuevos, y ayudará a comprender los mecanismos por detrás de la dinámica de las enfermedades zoonóticas y generar planes de manejo apropiados.

7 Perspectivas

1. Ampliar la búsqueda de coronavirus en muestras de hisopados anales y fecas de murciélagos.

2. Será relevante expandir el análisis a regiones más extensas del genoma viral para obtener una mejor comprensión de su diversidad y evolución, por lo que es de interés obtener genomas completos de los AlfaCoV, RNV y EEEV detectados.

3. Intentar el aislamiento viral de RNV y EEEV en células Vero o C6/36, a partir de muestras de hisopados positivos almacenados en la Sección Virología y nuevos muestreos.

4. Identificar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra RNV y EEEV en sueros de murciélagos y observar si existen variaciones temporales en las prevalencias.

5. Los roedores y aves han sido identificados como hospedadores amplificadores de RNV y EEEV, por ello es de suma importancia llevar a cabo un estudio sobre su circulación en estos vertebrados. Para lograr esto, se plantea realizar capturas y extracción de sangre, de aves y roedores, con el fin de analizar la presencia de anticuerpos neutralizantes en estos vertebrados.

6. Se continuará con el monitoreo de poblaciones de murciélagos para detectar la presencia de nuevos alfavirus en hisopados orales y anales/fecas.

7. Se evaluará la presencia de alfavirus, por detección molecular y por aislamiento viral, en sangre de murciélagos como un indicador de la capacidad de funcionar como reservorio, con potencial para actuar como fuente de virus para el vector.

8. Se continuará con la vigilancia de alfavirus en mosquitos en las inmediaciones de las colonias de murciélagos y en localidades no relevadas en el presente trabajo.

9. Proponemos analizar la comida sanguínea en hembras de mosquito alimentadas, capturadas en las inmediaciones de los refugios, a fin de conocer si estas se alimentan de los murciélagos.

8 Bibliografía

Abdoullah, B., Durand, G. A., Basco, L. K., El Bara, A., Bollahi, M. A., Bosio, L., Geulen, M., Briolant, S., & Boukhary, A. O. M. S. (2023). Seroprevalence of Alphaviruses (Togaviridae) among Urban Population in Nouakchott, Mauritania, West Africa. Viruses, 15(7), 1588. https://doi.org/10.3390/v15071588

Acciones para prevenir dengue y chikungunya. (2023, mayo 17). Intendencia de Montevideo. https://montevideo.gub.uy/noticias/salud-y-salubridad/acciones-para-prevenir-dengue-y-chikungunya.

Agnarsson, I., Zambrana-Torrelio, C. M., Flores-Saldana, N. P., & May-Collado, L. J. (2011). A time-calibrated species-level phylogeny of bats (chiroptera, Mammalia). *PLoS Currents*, *February*. https://doi.org/10.1371/currents.RRN1212

Aguilar, P. V., Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R., Ferro, C., Haddow, A. D., & Weaver, S. C. (2011). Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: Hidden under the dengue umbrella. *Future Virology*, *6*(6), 721–740. https://doi.org/10.2217/fvl.11.50

Aguirre, L. F., Nassar, J. M., Barquez, R. M., Medellín, R. a., Navarro, L., Rodríguez-Durán, A., & Rodríguez-Herrera, B. (2014). De esfuerzos locales a una iniciativa regional : La Red Latinoamericana y del Caribe para la Conservación de los Murciélagos (RELCOM). *Ecología En Bolivia*, *49*(2), 45–50.

Allen, T., Murray, K. A., Zambrana-Torrelio, C., Morse, S. S., Rondinini, C., Di Marco, M., Breit, N., Olival, K. J., & Daszak, P. (2017). Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nature Communications*, *8*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00923-8

Amman, B. R., Nyakarahuka, L., McElroy, A. K., Dodd, K. A., Sealy, T. K., Schuh, A. J., Shoemaker, T. R., Balinandi, S., Atimnedi, P., Kaboyo, W., Nichol, S. T., & Towner, J. S. (2014). Marburgvirus resurgence in Kitaka mine bat population after extermination attempts, Uganda. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(10), 1761–1764. https://doi.org/10.3201/eid2010.140696

Anthony, S. J., Ojeda-Flores, R., Rico-Chávez, O., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrelio, C. M., Rostal, M. K., Epstein, J. H., Tipps, T., Liang, E., Sanchez-Leon, M., Sotomayor-Bonilla, J., Aguirre, A. A., Ávila-Flores, R. A., Medellín, R. A., Goldstein, T., Suzán, G., Daszak, P., & Lipkin, W. I. (2013). Coronaviruses in bats from Mexico. *Journal of General Virology*, *94*(PART 5), 1028–1038. https://doi.org/10.1099/vir.0.049759-0

Anthony, Simon J., Johnson, C. K., Greig, D. J., Kramer, S., Che, X., Wells, H., Hicks, A. L., Joly, D. O., Wolfe, N. D., Daszak, P., Karesh, W., Lipkin, W. I., Morse, S. S., Mazet, J. A. K., & Goldstein, T. (2017). Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution*, *3*(1), 1–15. https://doi.org/10.1093/ve/vex012

Arrigo, N. C., Adams, A. P., & Weaver, S. C. (2010). Evolutionary Patterns of Eastern Equine Encephalitis Virus in North versus South America Suggest Ecological Differences and Taxonomic Revision. *Journal of Virology*, *84*(2), 1014–1025. https://doi.org/10.1128/jvi.01586-09

Arrigo, N. C., Paige Adams, A., Watts, D. M., Newman, P. C., & Weaver, S. C. (2010). Cotton rats and house sparrows as hosts for north and south american strains of eastern equine

encephalitis virus. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(9), 1373–1380. https://doi.org/10.3201/eid1609.100459

ATCC. (2013). Virology guide. *ATCC Guide*, 1–35. http://www.lgcstandards-atcc.org/Home/Form Confirmations/Thank You Guides

Baker, M. L., Schountz, T., & Wang, L. F. (2013). 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

Barrantes Murillo, D. F., Piche-Ovares, M., Gamboa-Solano, J. C., Romero, L. M., Soto-Garita, C., Alfaro-Alarcón, A., & Corrales-Aguilar, E. (2022). Serological Positivity against Selected Flaviviruses and Alphaviruses in Free-Ranging Bats and Birds from Costa Rica Evidence Exposure to Arboviruses Seldom Reported Locally in Humans. *Viruses*, *14*(1). https://doi.org/10.3390/v14010093

Bengochea, V., Berois, M., Reolan, E., & Zuninrr, P. (2003). *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatria*.

Botto Nuñez, G., Becker, D. J., & Plowright, R. K. (2019). The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiology and Infection*, *147*. https://doi.org/10.1017/S0950268819000682

Boyles, J. G., Cryan, P. M., McCracken, G. F., & Kunz, T. H. (2011). Economic importance of bats in agriculture. *Science*, *332*(6025), 41–42. https://doi.org/10.1126/science.1201366

Brook, C. E., & Dobson, A. P. (2015). Bats as "special" reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*, *23*(3), 172–180. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004

Brunini, S., França, D. D. S., Silva, J. B., Silva, L. N., Silva, F. P. A., Spadoni, M., & Rezza, G. (2017). High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil - Volume 23, Number 6—June 2017 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(6), 1025–1026.

Burgueño, A., Frabasile, S., Díaz, L. A., Cabrera, A., Pisano, M. B., Rivarola, M. E., Contigiani, M., & Delfraro, A. (2018). Genomic characterization and seroprevalence studies on alphaviruses in Uruguay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *98*(6), 1811–1818. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0980

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

Cámara, A., Díaz, G., Vega, V., Basualdo, M., & Contigiani, M. (2003). Seroprevalence of antibodies to Venezuelan equine encephalitis complex (subtypes IAB and VI) in humans from General Belgrano island, Formosa, Argentina. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *45*(4), 201–204. https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000400005

Carrington, C. V. F., Foster, J. E., Zhu, H. C., Zhang, J. X., Smith, G. J. D., Thompson, N., Auguste, A. J., Ramkissoon, V., Adesiyun, A. A., & Guan, Y. (2008). Detection and phylogenetic analysis of group 1 coronaviruses in South American bats. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(12), 1890–1893. https://doi.org/10.3201/eid1412.080642

Chen, R., Mukhopadhyay, S., Merits, A., Bolling, B., Nasar, F., Coffey, L. L., Powers, A., & Weaver, S.

C. (2018). ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, *99*, 761–762. www.ictv.global/report/togaviridae

Chu, D. K., Leung, C. Y., Gilbert, M., Joyner, P. H., Ng, E. M., Tse, T. M., Guan, Y., Peiris, J. S., & Poon, L. L. (2011). Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of virology*, *85*(23), 12815–12820. https://doi.org/10.1128/JVI.05838-11

Cleveland, C. J., Betke, M., Federico, P., Frank, J. D., Hallam, T. G., Horn, J., López, J. D., McCracken, G. F., Medellín, R. A., Moreno-Valdez, A., Sansone, C. G., Westbrook, J. K., & Kunz, T. H. (2006). Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *4*(5), 238–243. https://doi.org/10.1890/1540-9295(2006)004[0238:EVOTPC]2.0.CO;2

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

David M. Morens, Gregory K. Folkers, & Anthony S. Fauci. (2004). The challenge of emerging andre-emerging infectious diseases. *Nature*, *430*(July), 242–249. www.nature.com/nature

De Morais Bronzoni, R. V., Baleotti, F. G., Ribeiro Nogueira, R. M., Nunes, M., & Moraes Figueiredo, L. T. (2005). Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(2), 696–702. https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.696-702.2005

Deardorff, E. R., Forrester, N. L., Travassos Da Rosa, A. P., Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2009). Experimental infection of potential reservoir hosts with venezuelan equine encephalitis virus, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(4), 519–525. https://doi.org/10.3201/eid1504.081008

Diaz, M. B., & Botto, G. (2018a). *Propuesta de Área de Importancia para la Conservación de los Murciélagos (AICOM), Parque Municipal Grutas de Salamanca*. *August*. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29352.83202

Diaz, M. B., & Botto, G. (2018b). *Propuesta de Área de Importancia para la Conservación de Murciélagos (AICOM), Palmares de Caranday*. *August*. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29280.74248

Diaz, M. B., Rodales, A. L., Researcher, I., & Botto, G. (2018). *Propuesta de Área de Importancia para la Conservación de los Murciélagos (AICOM), Montes e Islas del Río Uruguay*. *October*. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.23257.16488

Dominguez, S. R., O'Shea, T. J., Oko, L. M., & Holmes, K. V. (2007). Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(9), 1295–1300. https://doi.org/10.3201/eid1309.070491

Donaldson, E. F., Haskew, A. N., Gates, J. E., Huynh, J., Moore, C. J., & Frieman, M. B. (2010). Metagenomic Analysis of the Viromes of Three North American Bat Species: Viral Diversity among Different Bat Species That Share a Common Habitat. *Journal of Virology*, *84*(24), 13004–13018. https://doi.org/10.1128/jvi.01255-10

Fagre, A. C., Cohen, L. E., Eskew, E. A., Farrell, M., Glennon, E., Joseph, M. B., Frank, H. K., Ryan, S. J., Carlson, C. J., & Albery, G. F. (2022). Assessing the risk of human-to-wildlife pathogen transmission for conservation and public health. *Ecology Letters*, *25*(6), 1534–1549.

https://doi.org/10.1111/ele.14003

Gamble, A., Garnier, R., Chambert, T., Gimenez, O., & Boulinier, T. (2020). Next-generation Serology: Integrating Cross-sectional and Capture–recapture Approaches to Infer Disease Dynamics. *The Bulletin of the Ecological Society of America*, *101*(2), 1–4. https://doi.org/10.1002/bes2.1670

Genta, M., Díaz, M., & Botto, G. (2017). *Propuesta de Sitio de Importancia para la Conservación de los Murciélagos (SICOM), Usina de Cuñapirú (Dpto. Rivera, Uruguay)*. *July*, 1–11. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16445.56807

Gil, L. H. V. G., Magalhaes, T., Santos, B. S. A. S., Oliveira, L. V., Oliveira-Filho, E. F., Cunha, J. L. R., Fraiha, A. L. S., Rocha, B. M. M., Longo, B. C., Ecco, R., Faria, G. C., Furtini, R., Drumond, S. R. M., Maranhão, R. P. A., Lobato, Z. I. P., Guedes, M. I. M. C., Teixeira, R. B. C., & Costa, E. A. (2021). Active circulation of madariaga virus, a member of the eastern equine encephalitis virus complex, in northeast brazil. *Pathogens*, *10*(8), 1–13. https://doi.org/10.3390/pathogens10080983

Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R., & Lee, C. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, *3*(1), 58. https://doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.58

Góes, L. G. B., Ruvalcaba, S. G., Campos, A. A., Queiroz, L. H., de Carvalho, C., Jerez, J. A., Durigon, E. L., Dávalos, L. I. I., & Dominguez, S. R. (2013). Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(10), 1711–1713. https://doi.org/10.3201/eid1910.130525

Guarino, H., Castilho, J. G., Souto, J., Oliveira, R. de N., Carrieri, M. L., & Kotait, I. (2013). Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Research*, *173*(2), 415–420. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.013

Guzmán-Terán, C., Calderón-Rangel, A., Rodriguez-Morales, A., & Mattar, S. (2020). Venezuelan equine encephalitis virus: The problem is not over for tropical America. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *19*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s12941-020-00360-4

Hernández-Aguilar, I., Lorenzo, C., Santos-Moreno, A., Naranjo, E. J., & Navarrete-Gutiérrez, D. (2021). Coronaviruses in bats: A review for the americas. *Viruses*, *13*(7), 1–14. https://doi.org/10.3390/v13071226

Hoyos-López, R., Suaza-Vasco, J., Rúa-Uribe, G., Uribe, S., & Gallego-Gómez, J. C. (2016). Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(10), 625–634. https://doi.org/10.1590/0074-02760160096

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990–993. https://doi.org/10.1038/nature06536

Kuno, G., Mackenzie, J. S., Junglen, S., Hubálek, Z., Plyusnin, A., & Gubler, D. J. (2017). Vertebrate reservoirs of arboviruses: Myth, synonym of amplifier, or reality? *Viruses*, *9*(7), 1–28. https://doi.org/10.3390/v9070185

Li, F., Li, W., Farzan, M., & Harrison, S. C. (2005). Structural biology: Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*, *309*(5742), 1864–1868.

https://doi.org/10.1126/science.1116480

Lim, Y., Ng, Y., Tam, J., & Liu, D. (2016). Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases*, *4*(4), 26. https://doi.org/10.3390/diseases4030026

Lima, F. E. D. S., Campos, F. S., Kunert Filho, H. C., Batista, H. B. D. C. R., Carnielli Júnior, P., Cibulski, S. P., Spilki, F. R., Roehe, P. M., & Franco, A. C. (2013). Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (Molossus molossus) and Brazilian free-tailed bats (Tadarida brasiliensis) from urban area of Southern Brazil. *Virus Genes*, *47*(1), 164–167. https://doi.org/10.1007/s11262-013-0899-x

Loayza Mafayle, R., Morales-Betoulle, M. E., Whitmer, S., Cossaboom, C., Revollo, J., Loayza, N. M., Méndez, H. A., Chuquimia Valdez, J. A., Subieta, F. A., Espinoza Morales, M. X., Canedo Sánchez, M. V., Romero, M. E. R., Brault, A. C., Hugues, H. R., Mendez-Rico, J., Malenfant, J. H., Shoemaker, T., Klena, J. D., Montgomery, J. M., & Marquina Salas, J. D. (2023). Rio Negro Virus Infection, Bolivia, 2021. *Emerging Infectious Diseases*, *29*(8), 1705–1708. https://doi.org/10.3201/eid2908.221885

Lucero Arteaga, F., Miragaya, M., Molina, N., Mondino, M., Bracamonte, C., Capitelli, G., Mundo, S., Torres, C., & Bratanich, A. (2023). Identification of coronaviruses in bats and rodents in northern and central Argentina. *Archives of Virology*, *168*(3), 1–7. https://doi.org/10.1007/s00705-023-05703-y

Luis, A. D., Hayman, D. T. S., O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C., Mills, J. N., Timonin, M. E., Willis, C. K. R., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Rupprecht, C. E., Wood, J. L. N., & Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1756). https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753

Lwande, O. W., Lutomiah, J., Obanda, V., Gakuya, F., Mutisya, J., Mulwa, F., Michuki, G., Chepkorir, E., Fischer, A., Venter, M., & Sang, R. (2013). Isolation of tick and mosquito-borne arboviruses from ticks sampled from livestock and wild animal hosts in Ijara District, Kenya. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *13*(9), 637–642. https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1190

Marandino, A., Vagnozzi, A., Craig, M. I., Tomás, G., Techera, C., Panzera, Y., Vera, F., & Pérez, R. (2019). Genetic and antigenic heterogeneity of infectious bronchitis virus in South America: implications for control programmes. *Avian Pathology*, *48*(3), 270–277. https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1583315

Mello, F. (2019). *Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay* (Issues 978-9974-0-1728–3).

Microbiología, S.-área, Burgueño, L. A., Dra, O., Delfraro, A., & Arbiza, C. J. (2012). *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Estudio de la circulación de arbovirus en Uruguay*.

Misra, V., Dumonceaux, T., Dubois, J., Willis, C., Nadin-Davis, S., Severini, A., Wandeler, A., Lindsay, R., & Artsob, H. (2009). Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. *Journal of General Virology*, *90*(8), 2015–2022. https://doi.org/10.1099/vir.0.010694-0

Mollentze, N., & Streicker, D. G. (2020). Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(17), 9423–9430.

https://doi.org/10.1073/pnas.1919176117

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-Soto, A., Taylor-Castillo, L., Vargas-Vargas, N., Rodríguez-Herrera, B., Jiménez, C., & Corrales-Aguilar, E. (2015). Neotropical Bats from Costa Rica harbour Diverse Coronaviruses. *Zoonoses and Public Health*, *62*(7), 501–505. https://doi.org/10.1111/zph.12181

Moreira Marrero, L., Botto Nuñez, G., Frabasile, S., & Delfraro, A. (2022). Alphavirus Identification in Neotropical Bats. *Viruses*, *14*(2). https://doi.org/10.3390/v14020269

Moreira Marrero, L., Botto Nuñez, G., Malta, L., Delfraro, A., & Frabasile, S. (2021). Ecological and Conservation Significance of Herpesvirus Infection in Neotropical Bats. *EcoHealth*. https://doi.org/10.1007/s10393-021-01530-2

Mukrimaa, S. S., Nurdyansyah, Fahyuni, E. F., YULIA CITRA, A., Schulz, N. D., غسان, د., Taniredja, T., Faridli, E. M., & Harmianto, S. (2016). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. In *Jurnal Penelitian Pendidikan Guru Sekolah Dasar* (Vol. 6, Issue August).

Novaes, R. L. M., Wilson, D. E., & Moratelli, R. (2021). A new species of Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) from Uruguay. *Vertebrate Zoology*, *71*, 711–722. https://doi.org/10.3897/VZ.71.E73146

Nunes, M. R. T., Faria, N. R., de Vasconcelos, J. M., Golding, N., Kraemer, M. U. G., de Oliveira, L. F., da Silva Azevedo, R. do S., da Silva, D. E. A., da Silva, E. V. P., da Silva, S. P., Carvalho, V. L., Coelho, G. E., Cruz, A. C. R., Rodrigues, S. G., da Silva Gonçalves Vianez, J. L., Nunes, B. T. D., Cardoso, J. F., Tesh, R. B., Hay, S. I., … da Costa Vasconcelos, P. F. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x

Nuñez, G. B., Genta, M., Díaz, M., Rodales, A. L., & González, E. M. (2018). Circannual sex distribution of the Brazilian free-tailed bat, tadarida brasiliensis (Chiroptera: Molosssidae), suggests migration in colonies from uruguay. *Mastozoologia Neotropical*, *25*(1), 213–219. https://doi.org/10.31687/saremmn.18.25.1.0.17

Nuñez, G. B., González, E. M., & Rodales, A. L. (2019). Conservation of bats (Mammalia: Chiroptera) from Uruguay: Current situation and perspectives. *Mastozoologia Neotropical*, *26*(1), 49–64. https://doi.org/10.31687/saremMN.19.26.1.0.05

O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Hayman, D. T. S., Luis, A. D., Peel, A. J., Plowright, R. K., & Wood, J. L. N. (2014). *HRP450bw.PDF*. *20*(5), 741–745. https://doi.org/10.3201/eid2005.130539

Osborne, C., Cryan, P. M., O'Shea, T. J., Oko, L. M., Ndaluka, C., Calisher, C. H., Berglund, A. D., Klavetter, M. L., Bowen, R. A., Holmes, K. V., & Dominguez, S. R. (2011). Alphacoronaviruses in new World bats: Prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans. *PLoS ONE*, *6*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019156

Parrish, C. R., Holmes, E. C., Morens, D. M., Park, E.-C., Burke, D. S., Calisher, C. H., Laughlin, C. A., Saif, L. J., & Daszak, P. (2008). Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New

Epidemic Diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *72*(3), 457–470. https://doi.org/10.1128/mmbr.00004-08

Pisano, M. B., Torres, C., Ré, V. E., Farías, A. A., Sánchez Seco, M. P., Tenorio, A., Campos, R., & Contigiani, M. S. (2014). Genetic and evolutionary characterization of Venezuelan equine encephalitis virus isolates from Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, *26*, 72–79. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.011

Plowright, R. K., Eby, P., Hudson, P. J., Smith, I. L., Westcott, D., Bryden, W. L., Middleton, D., Reid, P. A., McFarlane, R. A., Martin, G., Tabor, G. M., Skerratt, L. F., Anderson, D. L., Crameri, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L. F., Epstein, J. H., … McCallum, H. (2014). Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1798). https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2124

Plowright, R. K., Foley, P., Field, H. E., Dobson, A. P., Foley, J. E., Eby, P., & Daszak, P. (2011). Urban habituation, ecological connectivity and epidemic dampening: The emergence of hendra virus from flying foxes (Pteropus spp.). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1725), 3703–3712. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0522

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

Plowright, R. K., Sokolow, S. H., Gorman, M. E., Daszak, P., & Foley, J. E. (2008). Causal inference in disease ecology: Investigating ecological drivers of disease emergence. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *6*(8), 420–429. https://doi.org/10.1890/070086

Poon, L. L. M., Chu, D. K. W., Chan, K. H., Wong, O. K., Ellis, T. M., Leung, Y. H. C., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Suen, K. Y., Yuen, K. Y., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2005). Identification of a Novel Coronavirus in Bats. *Journal of Virology*, *79*(4), 2001–2009. https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.2001-2009.2005

Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., & Weaver, S. C. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Journal of Virology*, *75*(21), 10118–10131. https://doi.org/10.1128/jvi.75.21.10118-10131.2001

Quan, P. L., Firth, C., Conte, J. M., Williams, S. H., Zambrana-Torrelio, C. M., Anthony, S. J., Ellison, J. A., Gilbert, A. T., Kuzmin, I. V., Niezgoda, M., Osinubi, M. O. V., Recuenco, S., Markotter, W., Breiman, R. F., Kalemba, L., Malekani, J., Lindblade, K. A., Rostal, M. K., Ojeda-Flores, R., … Lipkin, W. I. (2013). Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(20), 8194–8199. https://doi.org/10.1073/pnas.1303037110

Quan, P. L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J. A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., Hutchison, S. K., Egholm, M., Osinubi, M. O. V., Niezgoda, M., Ogunkoya, A. B., Briese, T., Rupprecht, C. E., & Ian Lipkin, W. (2010). Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio*, *1*(4), 1–9. https://doi.org/10.1128/mBio.00208-

10

Reeves, L. E., Gillett-Kaufman, J. L., Kawahara, A. Y., & Kaufman, P. E. (2018). Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(8), e0006767. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006767

Romano-Lieber, N. S., & Iversson, L. B. (2000). Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. *Revista de Saúde Pública*, *34*(3), 236–242. https://doi.org/10.1590/s0034-89102000000300005

Samara, E. M., & Abdoun, K. A. (2014). Concerns about misinterpretation of recent scientific data implicating dromedary camels in epidemiology of middle east respiratory syndrome (MERS). *MBio*, *5*(4), 4–6. https://doi.org/10.1128/mBio.01430-14

Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Vallejo-Ruiz, V., & Reyes-Leyva, J. (2021). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta de M*[?]*xico*, *157*(1), 88–93. https://doi.org/10.24875/gmm.20000505

Schountz, T. (2014). Immunology of bats and their viruses: Challenges and opportunities. *Viruses*, *6*(12), 4880–4901. https://doi.org/10.3390/v6124880

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

Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, *24*, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005

Silva, L. J. da, & Angerami, R. N. (2008). Viroses emergentes no Brasil. *Viroses Emergentes No Brasil*, *40*(2), 224–229. https://doi.org/10.7476/9788575413814

Simas, P. V. M., DE Souza Barnabé, A. C., Durães-Carvalho, R., De Lima Neto, D. F., Caserta, L. C., Artacho, L., Jacomassa, F. A. F., Martini, M. C., Dos Santos, M. M. A. B., Felippe, P. A. N., Ferreira, H. L., & Arns, C. W. (2015). Bat coronavirus in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(4), 729–731. https://doi.org/10.3201/eid2104.141783

Streicker, D. G., Recuenco, S., Valderrama, W., Benavides, J. G., Vargas, I., Pacheco, V., Condori Condori, R. E., Montgomery, J., Rupprecht, C. E., Rohani, P., & Altizer, S. (2012). Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: Implications for transmission and control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1742), 3384–3392. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0538

Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, *24*(6), 490–502. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003

Tang, X. C., Zhang, J. X., Zhang, S. Y., Wang, P., Fan, X. H., Li, L. F., Li, G., Dong, B. Q., Liu, W., Cheung, C. L., Xu, K. M., Song, W. J., Vijaykrishna, D., Poon, L. L. M., Peiris, J. S. M., Smith, G. J. D., Chen, H., & Guan, Y. (2006). Prevalence and Genetic Diversity of Coronaviruses in Bats from China. *Journal of Virology*, *80*(15), 7481–7490. https://doi.org/10.1128/jvi.00697-06

Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S. J., & Murphy, W. J. (2005). A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*, *307*(5709), 580–584. https://doi.org/10.1126/science.1105113

Teeling, E. C., Vernes, S. C., Dávalos, L. M., Ray, D. A., Gilbert, M. T. P., Myers, E., & Bat1K Consortium. (2018). Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. *Annual Review of Animal Biosciences*, *6*, 23–46. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022811

Tu, C., Crameri, G., Kong, X., Chen, J., Sun, Y., Yu, M., Xiang, H., Xia, X., Liu, S., Ren, T., Yu, Y., Eaton, B. T., Xuan, H., & Wang, L. F. (2004). Antibodies to SARS coronavirus in civets. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(12), 2244–2248. https://doi.org/10.3201/eid1012.040520

Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures. *British Medical Journal*, *1*(5448), 1467–1470. https://doi.org/10.1136/bmj.1.5448.1467

Vijgen, L., Moës, E., Keyaerts, E., Li, S., & Van Ranst, M. (2008). A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods in Molecular Biology*, *454*, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-181-9_1

Vlasova, A. N., Kenney, S. P., Jung, K., Wang, Q., & Saif, L. J. (2021). Deltacoronavirus Evolution and Transmission: Current Scenario and Evolutionary Perspectives. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*(February), 1–8. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.626785

Voigt, C. C., & Kingston, T. (2015). *Christian C. Voigt · Tigga Kingston*. http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-25220-9

Weaver, S. C. (2005). Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Archives of Virology. Supplementum*, *19*, 33–44. https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5_4

Weaver, Scott C., Winegar, R., Manger, I. D., & Forrester, N. L. (2012). Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*, *94*(3), 242–257. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002

Zhang, G., Cowled, C., Shi, Z., Huang, Z., Bishop-Lilly, K. A., Fang, X., Wynne, J. W., Xiong, Z., Baker, M. L., Zhao, W., Tachedjian, M., Zhu, Y., Zhou, P., Jiang, X., Ng, J., Yang, L., Wu, L., Xiao, J., Feng, Y., … Wang, J. (2013). Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science*, *339*(6118), 456–460. https://doi.org/10.1126/science.1230835

Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., … Shi, Z. L. (2020). Erratum: Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin (Nature (1988) 81 11 (18-19)). *Nature*, *588*(7836), E6. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2951-z

9 Apéndice

Hibridación de cebadores

Ensayos Coronavirus

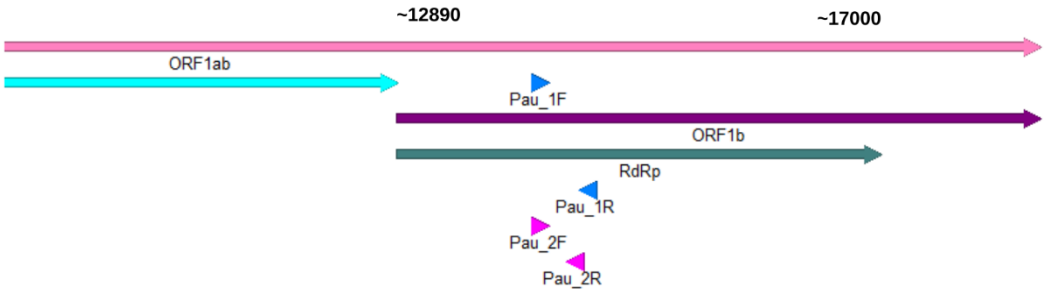


Figura A1. Ubicación de los cebadores utilizados en la RT-PCR anidada para amplificar 440 pb de una región conservada del gen RdRp de los Orthocoronavirus (Chu et al., 2011). *(Sección 3.2.1 Materiales y Métodos)*

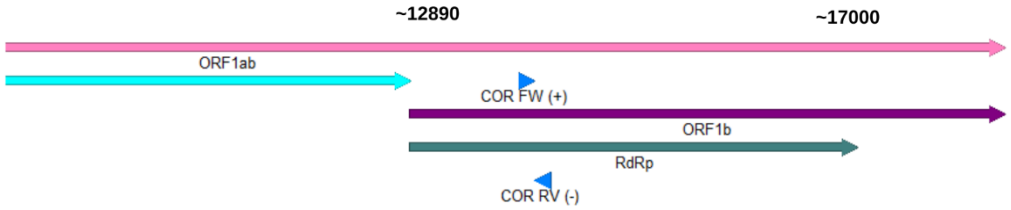


Figura A2. Ubicación de los cebadores utilizados en la RT-PCR para amplificar 251 pb de una región conservada del gen RdRp de los Orthocoronavirus (Vijgen et al., 2008). *(Sección 3.2.2 Materiales y Métodos)*

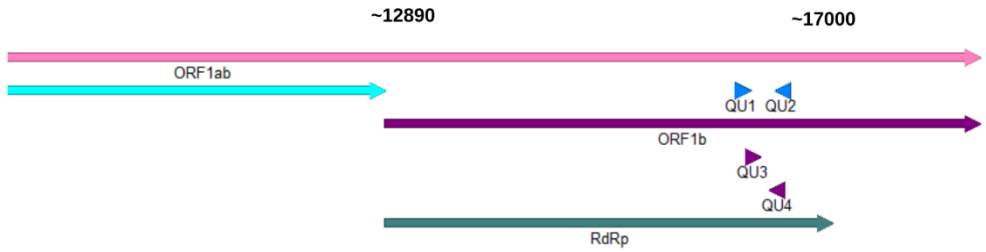


Figura A3. Ubicación de los cebadores utilizados en la RT-PCR anidada para amplificar 400 pb de una región conservada del gen RdRp de los Orthocoronavirus (Quan et al., 2010). *(Sección 3.2.3 Materiales y Métodos)*

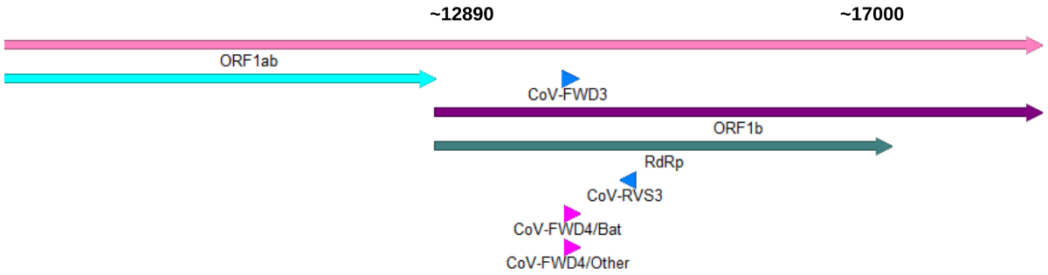


Figura A4. Ubicación de los cebadores utilizados en la RT-PCR semi-anidada para amplificar 434 pb de una región conservada del gen RdRp de los Orthocoronavirus (Anthony et al., 2015, modificado de Watanabe, S. et al., 2010). *(Sección 3.2.4 Materiales y Métodos)*

Ensayos Alfavirus

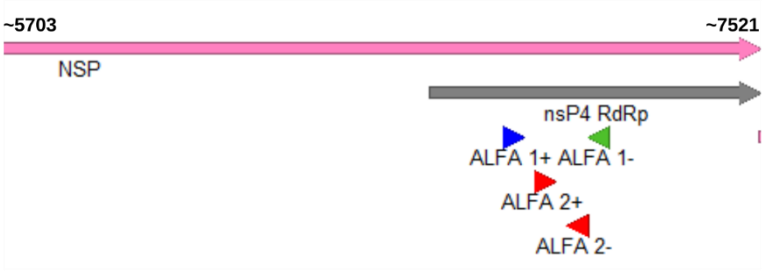


Figura A5. Ubicación de los cebadores utilizados en la RT-PCR anidada y semi-anidada genérica para amplificar 195 pb una región conservada del gen nsP4 de alfavirus (Sánchez-Seco et al., 2001). *(Sección 3.3.1 Materiales y Métodos)*

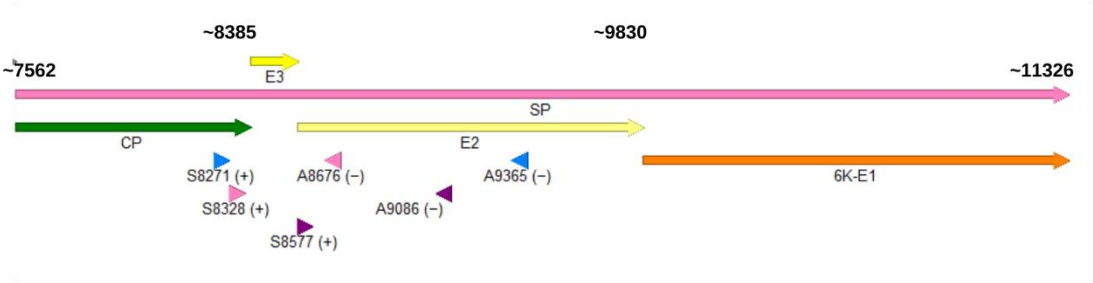


Figura A6. Ubicación de los cebadores utilizados en la RT-PCR anidada para amplificar 702 pb el gen E3 y la región N-terminal de E2 de virus del complejo de la encefalitis equina venezolana de alfavirus. Se realiza una primera PCR (fragmento de 1118 pb), seguido por 2 reacciones anidadas (PCR A y B). La secuencia de interés (702 pb) se resuelve mediante el alineamiento de los productos anidados de 369 y 534 pb, con una superposición de 120 pb (Pisano et al., 2014). *(Sección 3.3.1 Materiales y Métodos)*

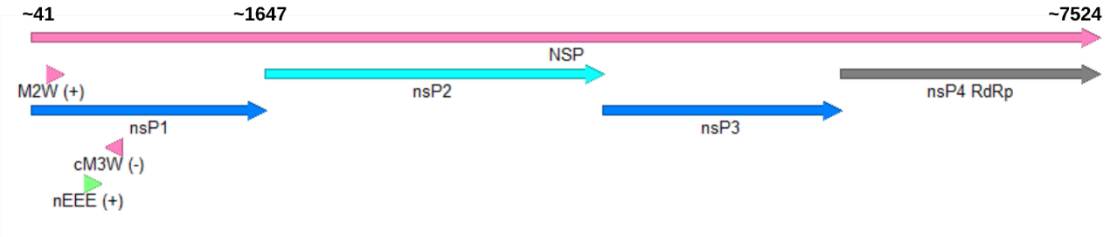


Figura A7. Ubicación de los cebadores específicos utilizados en la RT-PCR semi-anidada para amplificar 124 pb del gen nsP1 del virus del complejo de la encefalitis equina del este alfavirus (De Morais Bronzoni et al., 2005). *(Sección 3.3.1 Materiales y Métodos)*

Artículos publicados durante el desarrollo de esta tesis

- **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

- **Moreira Marrero, L.,** Botto Nuñez, G., Frabasile, S., & Delfraro, A. (2022). Alphavirus Identification in Neotropical Bats. *Viruses*, *14*(2), 269. https://doi.org/10.3390/v14020269

EcoHealth 18, 123–133, 2021
https://doi.org/10.1007/s10393-021-01530-2

EcoHealth

Check for updates

© 2021 EcoHealth Alliance

Original Contribution

Ecological and Conservation Significance of Herpesvirus Infection in Neotropical Bats

Lucía Moreira Marrero,[1,2] Germán Botto Nuñez,[2,3,4] Lucía Malta,[1] Adriana Delfraro,[1] and Sandra Frabasile[1]

[1]*Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de La República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay*
[2]*Programa Para La Conservación de Los Murciélagos de Uruguay, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay*
[3]*Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de La República, Montevideo, Uruguay*
[4]*Department of Microbiology and Immunology, Montana State University, Bozeman*

Abstract: Bats are the second most diverse order of mammals and key species for ecosystem functioning, providing a wide range of ecosystem services, from pest control to seed dispersal. Chiropterans are known for hosting a large diversity of viruses, in some cases with little or no effect to their health. Here, we report on the results of a screening for DNA (Herpesviridae) and RNA viruses (Rhabdovirus and Pneumovirus), finding a high prevalence and wide diversity of both Beta- and Gamma-Herpesvirus in insectivorous and hematophagous bats of the southern cone of South America. Our findings suggest that bats in the southern neotropics harbor a high diversity of herpesviruses and, at least in some cases, the viral community in the bat species is more strongly associated with ecological traits of the hosts, rather than their taxonomy. The presence of a separate clade into the *Gammaherpesvirinae* subfamily in the common vampire bat suggests the independent circulation of herpesviruses in hematophagous and insectivorous bats and highlights the properness of these viruses to track vampire bats' population structure for rabies studies. Hence, we suggest that as other pathogens viruses may be used to track the population dynamics of their hosts, including movement and demographics.

Keywords: Herpesvirus, Chiroptera, Uruguay, Rabies virus, Pneumovirus

Introduction

Bats (Order *Chiroptera*) are known as the second (after rodents) most diverse and widely disperse mammal order in the world, comprising over 1300 species (Teeling et al. 2018). They represent about 20% of all known mammal species and are grouped in two suborders: Yinpterochiroptera and Yangochiroptera, consisting in seven and 14 families, respectively (Teeling et al. 2018). Bats possess a unique set of features among mammals, including the potential to fly long distances, migratory and gregarious habits, and longevity. On top of these attributes, bats provide key ecosystem services, ranging from insect population control to seed dispersal and forest regeneration (Teeling et al. 2018). In recent years, interest in bats as possible reservoir hosts for emerging viral pathogens to

Lucía Moreira Marrero and Germán Botto Nuñez have contributed equally to this work.

Supplementary Information: The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s10393-021-01530-2.

Published online: June 28, 2021

Correspondence to: Adriana Delfraro, e-mail: adriana@fcien.edu.uy; Sandra Frabasile, e-mail: sfrabasile@fcien.edu.uy

humans has increased in line with increased reporting on serological evidences, viral isolation and detection of viruses from bat tissues (Calisher et al. 2006; Brook and Dobson 2015). However, the fact that bats can harbor a wide variety of viruses is not enough to trigger the emergence or re-emergence of pathogens that threat human health. This relationship must be explored in studies that involve not only bats' features but also natural changes and anthropogenic modifications of the environment (López-Baucells et al. 2017; Plowright et al. 2017; Botto Nuñez et al. 2019a).

At least 24 viral families of viruses have been known to infect bat families from both suborders (Hayman 2016). Some highly infectious ARN viruses such as *Henipavirus* (*Paramyxoviridae*) (Chua et al. 2000), severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) (*Coronaviridae*) (Li et al. 2005), filoviruses (*Filoviridae*) (Leroy et al. 2005), or rabies virus (*Rhabdoviridae*), have been demonstrated to be related with the zoonotic emergence and human infections. In the case of *Pneumoviridae*, a clade of viruses related with mouse pneumovirus has been reported from bats of the Yinpterochiroptera suborder (Drexler et al. 2012).

Among DNA viruses, herpesviruses in bats have been reported in an early study by Tandler where cytomegalovirus-like particles were detected in bats by electron microscopy images (Tandler 1996; Wibbelt et al. 2007). The order Herpesvirales is a group of DNA viruses, which consists of three families: *Alloherperviridae*, *Malacoherpesviridae* and *Herpesviridae* (Davison et al. 2009). The latter is divided in three subfamilies *Alpha-*, *Beta-* and *Gammaherpesvirinae* (Alpha-HV, Beta-HV, Gamma-HV, respectively) according to their viral structure, biological properties, sequences similarities, replicative cycles and cytopathogenicity. *Herpesviridae* family accounts for the most diversity within the herpesviruses, with ten out of the thirteen genera grouped in the family (Sasaki et al. 2014).

Despite that numerous studies of viral discovery have been carried out in bats around the world, little is known about Uruguayan bats and the viruses they harbor. There are 22 bat species recorded in Uruguay, belonging to Vespertilionidae, Molossidae and Phyllostomidae families, with frugivorous, insectivore and hematophagous diets (Botto Nuñez et al. 2019b). The most recent viral study performed in Uruguayan bats focused on the antigenic and genetic characterization of rabies viruses (RABV) detected in bats and livestock, during the first outbreak of sylvatic rabies in the country, occurred in 2007 (Guarino et al. 2013). Hence, the aim of this study is to carry on the first molecular detection and genetic characterization of DNA and RNA viruses from different species of bats from Uruguay, focusing on herpesvirus (HV), (RABV) and pneumovirus (PNE).

Material and Methods

Ethic Statements

The capture and manipulation of the wild animals was made by trained and authorized personal under two scientific capture permits issued by the National Fauna Office at the Secretary of Livestock, Agriculture and Fisheries (MGAP): case files: 176/2012 (Aug. 4th 2012) and 161/14 (Apr. 4th 2014).

Area of Study

Uruguay is located at 30°–35° (South latitude), and 53°–58° (West longitude) between Argentina and Brazil in America Latina. It is divided administratively in 19 departments (Fig. 1) and has a temperate climate with four clearly delimitated seasons, with an annual average temperature of 17.5° C.

Sample Collection

A total of 77 oral swabs from nine different species of bats: *Desmodus rotundus*, *Eumops bonariensis*, *Molossops temminckii*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Tadarida brasiliensis*, *Eptesicus diminutus*, *Eptesicus furinalis* and *Myotis spp.* (Table 1), were collected between year 2013 and 2015 at five departments (Artigas, Rivera, Maldonado, Rocha and Montevideo) of Uruguay (Fig. 1). The oral swabs were picked up from bats and placed in cryotubes with 200 µL of viral buffer (AVL® buffer from a Kit of Qiagen, Hilden, Germany), stored at room temperature during transport to the laboratory, where they were processed immediately. Sampled bats were captured using mist nets at the entry of identified roost sites, at a rural zone at an abandoned electric power station, in a forest and also at the botanic garden of Montevideo city. When bats were removed from the net, they were placed in a smooth cloth bag. Sex, reproductive condition, date of capture, taxonomic identity and external measurements were recorded. Species were identified using the last available national field guide, based on external characteristics (González and Martínez-Lanfranco 2010). The bats from the Rivera colony

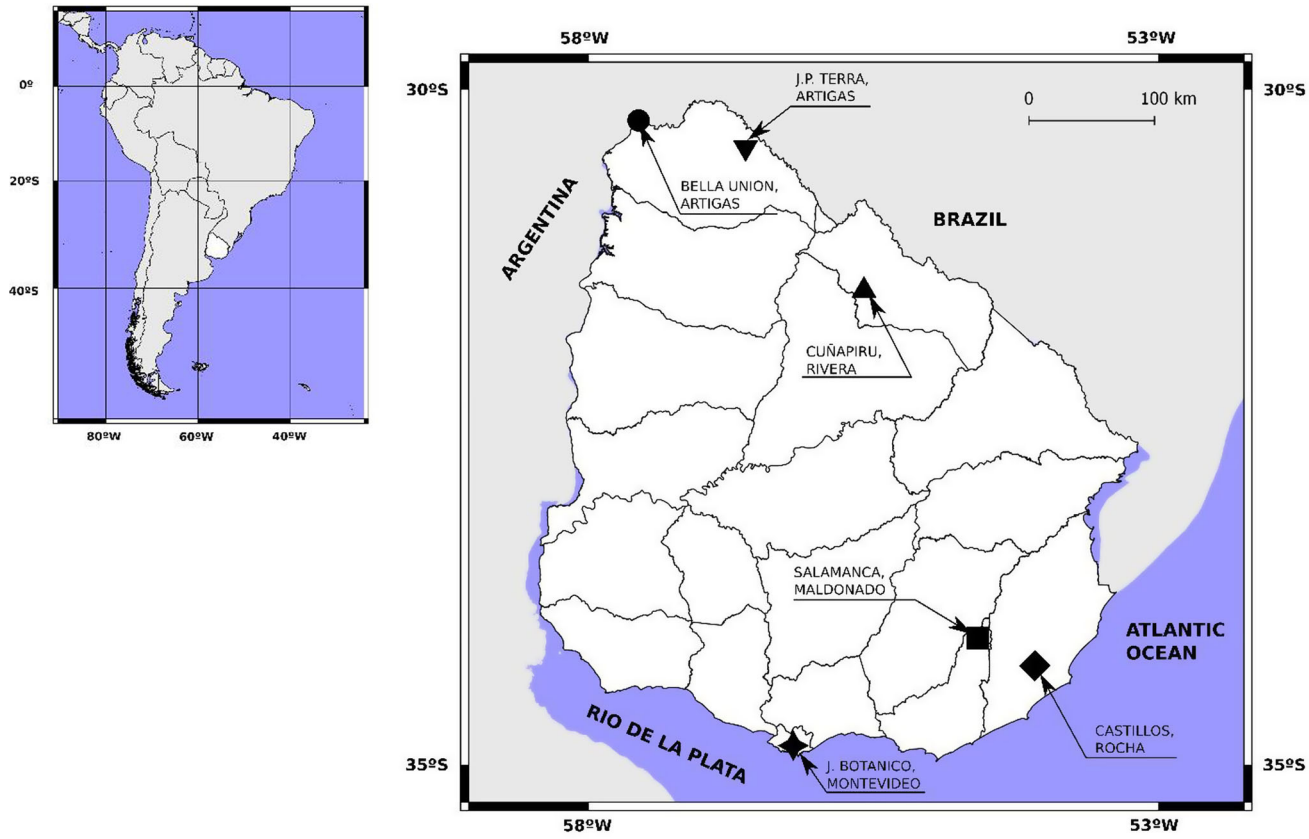


Figure 1. Continental position of Uruguay and geographic distribution of the samples within the country, showing the 19 s-order administrative units (Departments). Reference: inverted triangle Artigas (Juan P. Terra), circle Artigas (Bella Unión), triangle Rivera (Cuñapirú), square Maldonado (Salamanca), diamond Rocha (Castillos), four pointed star Montevideo.

Table 1. Species of Bats, Number of Samples, Georeferenced Place and Year of Capture.

Family	Species	Samples	Locality	Department	Georeference	Year
Molossidae	*Eumops bonariensis*	1	Colonia J.P. Terra	Artigas	30.44 S, 56.63 W	2013
	Molossops temminckii	2	Colonia J.P. Terra	Artigas	30.44 S, 56.63 W	2013
	Tadarida brasiliensis	28	Usina Cuñapirú	Rivera	31.52 S, 55.59 W	2015
	Molossus molossus	3	Castillos	Rocha	34.29 S, 54.06 W	2013
	Molossus molossus	1	Colonia J. P. Terra	Artigas	30.44 S, 56.63 W	2013
	Molossus rufus	1	Bella Unión	Artigas	30.23 S, 57.57 W	2015
Phyllostomidae	*Desmodus rotundus*	19	Grutas de Salamanca	Maldonado	34.48 S, 54.61 W	2013
Vespertilionidae	*Eptesicus furinalis*	2	Castillos	Rocha	34.29 S, 54.06 W	2013
	Eptesicus furinalis	2	Colonia J.P. Terra	Artigas	30.44 S, 56.63 W	2013
	Eptesicus furinalis	1	Jardín botánico	Montevideo	34.86 S, 56.20 W	2015
	Eptesicus diminutus	2	Colonia J. P. Terra	Artigas	30.44 S, 56.63 W	2013
	Myotis spp.	2	Colonia J. P. Terra	Artigas	30.44 S, 56.63 W	2013
	Myotis spp.	13	Usina Cuñapirú	Rivera	31.52 S, 55.59 W	2015

were wing banded as part of a long-term study in the colony. When collected, voucher specimens were deposited at the mammal scientific collection of the National Museum of Natural History in Montevideo (MNHN).

Collected voucher specimens were: sample 19, catalog number EEM2327 and sample 24, catalog number EEM2326 (see supplementary Table 3).

Extraction of Viral Nucleic Acids and Controls

Total viral nucleic acids of all oral swab samples were extracted using a commercial kit QIAmp® Viral RNA (Qiagen, Hilden, Germany) according with manufacturer's instructions. Five hundred microliters of the same AVL ® buffer was added to the cryotubes with the swab to complete a volume easy to handle. Also 5.6 µL of RNA *carrier* (Qiagen) was added and incubated 10 min at room temperature to continue with the manufacturer's instructions. Nucleic acid extractions were aliquoted and frozen at − 80 °C until the molecular analysis.

A positive control for RABV assay was kindly supplied by Dr. H. Guarino from Veterinary Faculty. Total RNA from a brain sample of a field-strain-infected mouse was extracted with TRIZOL® according to the manufacturer´s instructions.

For PNE assays control, a prototype (Long) strain of Respiratory Syncytial Virus (RSV) was propagated in HEp-2 cell cultures. The total RNA extraction from the infected culture was prepared using TRIZOL® protocol with minor modification.

For HV assay, a human Herpes Simplex type 1 strain (HSV) available at the Virology laboratory was propagated in Vero cells. The protocol followed was similar that the one employed to produce the PNE control.

PCR Screening

RABV Assays

A 250 bp fragment of the nucleoprotein gene was amplified by reverse transcription (RT) using specific primers (Supplementary Table 1) and a nested polymerase chain reaction (nested PCR) assay according to Bordignon et al. and Beltran et al. with minor modification (Bordignon et al. 2005; Beltran et al. 2014).

PNE Assays

A 250 bp fragment of the RNA polymerase gene was amplified in a RT-nested PCR using degenerated primers (Supplementary Table 1) according to Tong et al. with minor modifications (Tong et al. 2008).

HV Assays

A fragment between 215 and 315 bp of the DNA polymerase gene was amplified in a multiplex-nested PCR according to Vandevanter et al., with five degenerated oligonucleotides (Supplementary Table 1) (Vandevanter et al. 1996). RT-PCR assays are described in detail in the Supplementary information.

Sequencing and Phylogenetic Analysis

Purification of PCR products of positive samples and nucleotide sequencing (plus and minus strands) were carried out at Macrogen Inc., Korea, with the same primers used in the nested PCR assays.

Sequences were reviewed and edited with BioEdit v7.2.5 software (Hall 1999) and compared with GenBank database sequences, using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (Camacho et al. 2009) (Supplementary Table 2). Alignments were constructed using ClustalW (Thompson et al. 1994), and Muscle (Edgar 2004). To estimate the most suitable model of nucleotide substitution, ModelGenerator v0.85 software was used (Keane et al. 2006). Phylogenetic reconstruction was done under the maximum likelihood (ML) criterion, using PhyML software (Guindon et al. 2010). Statistical supports of the tree nodes were calculated by approximate likelihood ratio test (aLRT).

Data Analysis

Total HV prevalence (i.e., Beta-HV and Gamma-HV together) and prevalence of each subfamily (i.e., Beta-HV and Gamma-HV) were analyzed using logistic regressions. We fitted six univariate regressions for each analysis (i.e., Beta-HV + Gamma-HV, Beta-HV, Gamma-HV). For the univariate analyses we used as predictors the host species identity (both as multinomic and comparing *T. brasiliensis* [the one with the highest prevalence] with all the others); the locality of capture (both as multinomic and comparing Cuñapirú [the one with the highest prevalence] with all the others), sex of the host and age class (adult vs juvenile). For those variables with a significant effect on the viral infection, we calculated the odds ratios (OR) as a measure of strength of the association (Supplementary Tables 4–6). We used Akaike's information criterion and Akaike's weights to compare the resulting models. All analyses were performed in R v3.6.2.(R Core Team 2019).

Results

A total of 77 samples from nine autochthonous bats species, collected in 2013 and 2015, at five departments of Uruguay were screened for both DNA and RNA viruses (Table 2 and Supplementary Table 3). *Tadarida brasiliensis* ($n = 28$), was the most frequent bat species, while *D. rotundus* ($n = 19$) and *Myotis spp.* ($n = 15$) accounted for the second and third more frequently sampled bat species. The other bat species were less represented: *E. furinalis* ($n = 5$), *M. molossus* ($n = 4$), *E. diminutus* ($n = 2$) together with *M. temminckii* ($n = 2$), *M. rufus* ($n = 1$) and *E. bonariensis* ($n = 1$).

None of the analyzed samples was positive for RABV or PNE amplification (Table 2 and Supplementary Table 3). On the other hand, 48 of the 71 analyzed samples for HV (67.6%) resulted positive. The distribution of positive samples by species was as follows; *T. brasiliensis* ($n = 25/28$, 89.3%), *D. rotundus* ($n = 6/14$, 42.8%), *Myotis spp.* ($n = 8/15$, 53.3%), *E. furinalis* ($n = 2/5$, 40%), *M. molossus* ($n = 4/4$, 100%), *E. diminutus* ($n = 1/1$, 100%), *M. temminckii* ($n = 1/2$, 50%), *M. rufus* ($n = 1/1$, 100%), *Eumops bonariensis* ($n = 0/1$, 0%) (Table 2, Fig. 3).

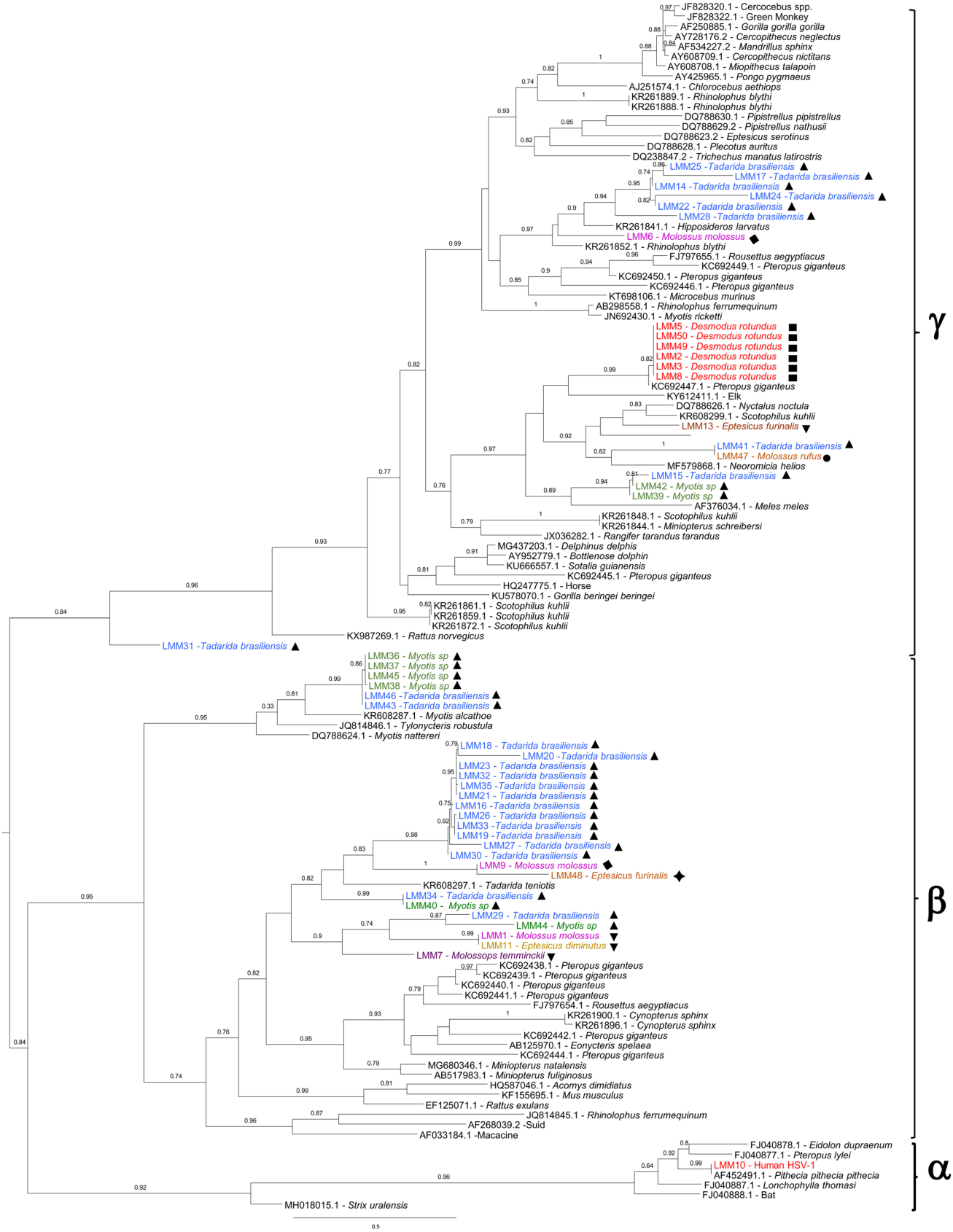
Phylogenetic Analysis

From these positive samples (laboratory code LMM*), high-quality sequences were obtained in 47 amplicons and subsequently included in the phylogenetic analysis. One sample (LMM4) was not included in the analysis, despite been amplified, due to poor sequence quality. Partial polymerase sequences were edited and aligned with 72 sequences downloaded from GenBank, representative of the three subfamilies of *Herpesviridae* and isolated from diverse bat species and other vertebrates. Maximum likelihood phylogeny showed that viruses from the Alpha-, Beta- and Gamma-HV subfamilies consistently grouped together with significant aLRT support. The samples obtained in this study grouped with sequences from Beta-HV, and Gamma-HV. No Alpha -HV were found in these samples. Twenty-seven samples (56.3%) grouped with sequences from Beta-HV, whereas 20 (41.6%) corresponded to Gamma-HV. Sample codes and species are indicated on the phylogenetic tree, together with accession numbers and hosts for the sequences downloaded from GenBank (Fig. 2). Among Gamma-HV, *D. rotundus* viruses clustered in a monophyletic group (aLRT = 0.99) together with KC692447.1, an HV collected in a *Pteropus giganteus* from Bangladesh (Anthony et al. 2013). The whole group displayed a nucleotide identity of 98% (available upon request). Gamma-HV from insectivorous bats grouped in different clusters, and displayed nucleotide identities between 55–76% when compared with other HV. A group of samples from *T. brasiliensis* from Rivera clustered in a monophyletic group (aLRT = 0.94), and together with an HV from *M. molossus* captured in Rocha grouped in a subclade of Gamma-HV (aLRT = 0.99) which included diverse HV from Asian and European bats and other vertebrates. A second group of

Table 2. Rhabdovirus, Pneumovirus and Herpesvirus results: Positive Samples/Samples Analyzed (% [91% Exact Binomial Confidence Interval]).

Family	Bat species	*Rhabdoviridae*	*Herpesviridae*		
			Pneumoviridae	*Beta*	*Gamma*
Phyllostomidae	*D. rotundus*	0/19 (0% [0.0–17.6])	0/19 (0% [0.0–17.6])	0/14 (0% [0.0–23.2])	6/14 (43% [17.7–71.1])
Molossidae	*E. bonariensis*	0/1 (0% [0.0–97.5])	0/1 (0% [0.0–97.5])	0/1 (0% [0.0–97.5])	0/1 (0% [0.0–97.5])
	M. temminckii	0/2 (0% [0.0–84.2])	0/2 (0% [0.0–84.2])	1/2 (50% [12.6–98.7])	0/2 (0% [0.0–84.2])
	M. molossus	0/4 (0% [0.0–60.2])	0/4 (0% [0.0–60.2])	2/4 (0.5% [6.7–93.2])	*1/4 (25% [0.6–80.6])
	M. rufus	0/1 (0% [0.0–97.5])	0/1 (0% [0.0–97.5])	0/1 (0% [0.0–97.5])	1/1 (100% [2.5–100.0])
	T. brasiliensis	0/28 (0% [0.0–12.3])	0/28 (0% [0.0–12.3])	16/28 (57% [37.2, 75.5])	9/28 (32% [15.9–52.4])
Vespertilionidae	*E. diminutus*	0/2 (0% [0.0–84.2])	0/2 (0% [0.0–84.2])	1/1 (100% [2.5–100.0])	0/1 (0% [0.0–97.5])
	E. furinalis	0/5 (0% [0.0–52.2])	0/5 (0% [0.0–52.2])	1/5 (20% [0.5–71.6])	1/5 (20% [0.5–71.6])
	Myotis spp.	0/15 (0% [0.0–21.8])	0/15 (0% [0.0–21.8])	6/15 (40% [16.3–67.7])	2/15 (13% [1.7–40.5])
Total		0/77 (0% [0.0–4.7])	0/77 (0% [0.0–4.7])	27/71 (38% [26.8–50.3])	20/71 (28% [18.1–40.1])

(*) One of the Samples of *M. molossus* Could Not be Assigned to *Beta-* or *Gammaherpesvirus*.


JF828320.1 - Cercocebus spp.
JF828322.1 - Green Monkey
AF250885.1 - Gorilla gorilla gorilla
AY728176.2 - Cercopithecus neglectus
AF534227.2 - Mandrillus sphinx
AY608709.1 - Cercopithecus nictitans
AY608708.1 - Miopithecus talapoin
AY425965.1 - Pongo pygmaeus
AJ251574.1 - Chlorocebus aethiops
KR261889.1 - Rhinolophus blythi
KR261888.1 - Rhinolophus blythi
DQ788630.1 - Pipistrellus pipistrellus
DQ788629.2 - Pipistrellus nathusii
DQ788623.2 - Eptesicus serotinus
DQ788628.1 - Plecotus auritus
DQ238847.2 - Trichechus manatus latirostris
LMM25 -Tadarida brasiliensis
LMM17 -Tadarida brasiliensis
LMM14 -Tadarida brasiliensis
LMM24 -Tadarida brasiliensis
LMM22 -Tadarida brasiliensis
LMM28 -Tadarida brasiliensis
KR261841.1 - Hipposideros larvatus
LMM6 - Molossus molossus
KR261852.1 - Rhinolophus blythi
FJ797655.1 - Rousettus aegyptiacus
KC692449.1 - Pteropus giganteus
KC692450.1 - Pteropus giganteus
KC692446.1 - Pteropus giganteus
KT698106.1 - Microcebus murinus
AB298558.1 - Rhinolophus ferrumequinum
JN692430.1 - Myotis ricketti
LMM5 - Desmodus rotundus
LMM50 - Desmodus rotundus
LMM49 - Desmodus rotundus
LMM2 - Desmodus rotundus
LMM3 - Desmodus rotundus
LMM8 - Desmodus rotundus
KC692447.1 - Pteropus giganteus
KY612411.1 - Elk
DQ788626.1 - Nyctalus noctula
KR608299.1 - Scotophilus kuhlii
LMM13 - Eptesicus furinalis
LMM41 -Tadarida brasiliensis
LMM47 - Molossus rufus
MF579868.1 - Neoromicia helios
LMM15 -Tadarida brasiliensis
LMM42 - Myotis sp
LMM39 - Myotis sp
AF376034.1 - Meles meles
KR261848.1 - Scotophilus kuhlii
KR261844.1 - Miniopterus schreibersi
JX036282.1 - Rangifer tarandus tarandus
MG437203.1 - Delphinus delphis
AY952779.1 - Bottlenose dolphin
KU666557.1 - Sotalia guianensis
KC692445.1 - Pteropus giganteus
HQ247775.1 - Horse
KU578070.1 - Gorilla beringei beringei
KR261861.1 - Scotophilus kuhlii
KR261859.1 - Scotophilus kuhlii
KR261872.1 - Scotophilus kuhlii
KX987269.1 - Rattus norvegicus
LMM31 -Tadarida brasiliensis
LMM36 - Myotis sp
LMM37 - Myotis sp
LMM45 - Myotis sp
LMM38 - Myotis sp
LMM46 -Tadarida brasiliensis
LMM43 -Tadarida brasiliensis
KR608287.1 - Myotis alcathoe
JQ814846.1 - Tylonycteris robustula
DQ788624.1 - Myotis nattereri
LMM18 - Tadarida brasiliensis
LMM20 -Tadarida brasiliensis
LMM23 - Tadarida brasiliensis
LMM32 - Tadarida brasiliensis
LMM35 -Tadarida brasiliensis
LMM21 - Tadarida brasiliensis
LMM16 -Tadarida brasiliensis
LMM26 - Tadarida brasiliensis
LMM33 -Tadarida brasiliensis
LMM19 -Tadarida brasiliensis
LMM27 - Tadarida brasiliensis
LMM30 - Tadarida brasiliensis
LMM9 - Molossus molossus
LMM48 - Eptesicus furinalis
KR608297.1 - Tadarida teniotis
LMM34 - Tadarida brasiliensis
LMM40 - Myotis sp
LMM29 - Tadarida brasiliensis
LMM44 - Myotis sp
LMM1 - Molossus molossus
LMM11 - Eptesicus diminutus
LMM7 - Molossops temminckii
KC692438.1 - Pteropus giganteus
KC692439.1 - Pteropus giganteus
KC692440.1 - Pteropus giganteus
KC692441.1 - Pteropus giganteus
FJ797654.1 - Rousettus aegyptiacus
KR261900.1 - Cynopterus sphinx
KR261896.1 - Cynopterus sphinx
KC692442.1 - Pteropus giganteus
AB125970.1 - Eonycteris spelaea
KC692444.1 - Pteropus giganteus
MG680346.1 - Miniopterus natalensis
AB517983.1 - Miniopterus fuliginosus
HQ587046.1 - Acomys dimidiatus
KF155695.1 - Mus musculus
EF125071.1 - Rattus exulans
JQ814845.1 - Rhinolophus ferrumequinum
AF268039.2 -Suid
AF033184.1 -Macacine
FJ040878.1 - Eidolon dupraenum
FJ040877.1 - Pteropus lylei
LMM10 - Human HSV-1
AF452491.1 - Pithecia pithecia pithecia
FJ040887.1 - Lonchophylla thomasi
FJ040888.1 - Bat
MH018015.1 - Strix uralensis
0.5
γ
β
α

◀**Figure 2.** Phylogenetic tree of partial Herpesviridae DNA polymerase gene. Positive samples are coded as LMM* and species and localities are shown. The final alignment was 495 nucleotide length. Phylogeny was inferred under the maximum likelihood (ML) criterion and the GTR model of nucleotide substitution. Statistical supports of the nodes were calculated by aLRT and values > to 0.75 are shown. Downloaded sequences are identified by the GenBank accession number. Sequences were submitted to GenBank and DDBJ. The accession numbers are as follows: MT036389-036394, MT036631-036634, MT066061, MT074099-074101, MT906861-906862, MT903351-903357, MT876198, MT936425-936434, MW029377-029384, LC579821-579822, LC578846, LC583830-583031, LC589954.

Gamma-HV clustered in another subclade (aLRT = 0.97) together with Gamma-HV from other vertebrates, including bats. These HV were found in several bat species and localities: two from *T. brasiliensis*, and two *Myotis spp.*, all from Rivera; one *E. furinalis* and one *M. rufus*, both captured in Artigas. Although not directly related, these HV grouped in the same subclade as the *D. rotundus* Gamma-HV. One *T. brasiliensis* (LMM31) captured in Rivera was the most divergent of the group (40 to 52% identity), displaying a basal position in the Gamma-HV clade (aLRT = 0.84) (Fig. 2).

Among Beta-HV, samples obtained in this study grouped in two main branches. Most HV from *T. brasiliensis* included in the study captured in Rivera, together with an HV from *M. molossus* from Rocha, one HV from *Myotis spp.* (Rivera) and the only HV from Montevideo (in *E. furinalis)* formed a group with moderate support (aLRT = 0.82); the only sequence from the GenBank database in the group was KR608297.1 (a Beta-HV from *Tadarida teniotis*, Spain) (Pozo et al. 2016). Twelve of the 16 Beta-HV from *T. brasiliensis* collected in Rivera displayed a nucleotide identity of 90–100% and formed a monophyletic group with aLRT = 0.98 (Table 2 and Fig. 2).

In the same branch, a subclade (aLRT = 0.90) included viruses from different bat species and two localities: *T. brasiliensis*, and *Myotis spp.*, both from Rivera and a group of HV from *M. molossus*, *E. diminutus* and *M. temminckii* all captured in Artigas.

The second main branch in the Beta-HV displayed an aLRT = 0.95 and included viruses from four *Myotis spp.* and two *T. brasiliensis* all from Rivera, and clustered together with HV from bats from Germany, Spain and China. As well as for the Gamma-HV from insectivorous bats reported in this work, the Beta-HV shared between 57 and 72% nucleotide identity with the previously reported sequences retrieved from GenBank.

For most species, except for *M. rufus* (just one individual) and *D. rotundus*, infection with Beta-HV infection was more frequent than Gamma-HV (Fig. 3). Only *D. rotundus* showed infection exclusively with Gamma-HV, while *M. temminckii* and *E diminutus* were only infected by Beta-HV. However, sample sizes in these species were small.

Logistic Regression

In the logistic regression models, *T. brasiliensis* showed an increased risk for HV infection, both when combining Beta- and Gamma-HV (OR = 6.88, p value < 0.01) and when considering only Beta-HV (OR = 3.74, p value = 0.01). The bats captured at Cuñapirú also showed higher risk of being infected both when combining Beta- and Gamma-HV (OR = 3.73, p value = 0.01) and when considering only Beta-HV (OR = 5.87, p value < 0.01). Finally, juvenile bats showed reduced risk of infection, but only when considering together Beta- and Gamma-HV (OR 0.10, p value = 0.05) (Supplementary Tables 4–6). In the multivariate models, the significant effects of the host species identity and the locality of capture were lost, suggesting an interaction between both variables (*T. brasiliensis* is the most frequent species captured in Cuñapirú).

Discussion

In this study, 77 samples from nine different species of autochthonous bats from Uruguay were analyzed in order to gain knowledge about the viruses they can harbor. In our country, the first record of viruses associated with bats was the report of RABV from both hematophagous and insectivorous bat species during the 2007 livestock rabies outbreak (Guarino et al. 2013). Despite this, the absence of positive samples for RABV in this work (Table 2) may be explained by the low prevalence observed in wild bat populations. Furthermore, when samples are obtained from free-caught individuals, and not following rabies cases or outbreaks, prevalences have been shown to be significantly lower than those calculated from submitted individuals (Sheeler-Gordon and Smith 2001; Escobar et al. 2013, 2015; Astorga et al. 2015). In our study, only 77 individuals were

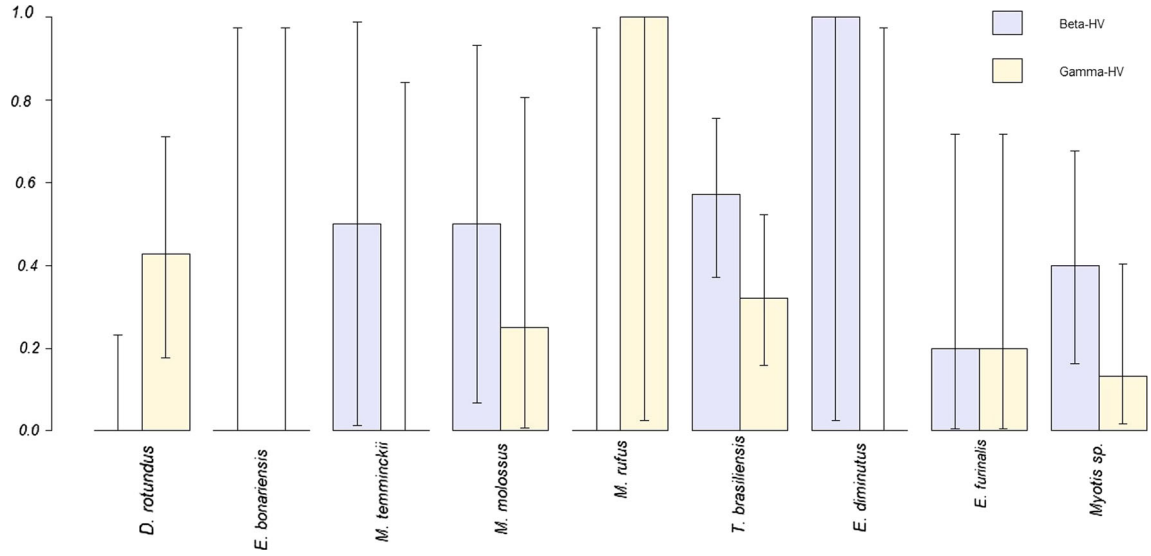


Figure 3. Observed Beta- and Gamma-HV prevalence across species. Error bars show exact binomial 95% confidence intervals. Except for *D. rotundus* and *M. rufus*, there is a general pattern of more frequent Beta-HV infection. Given sample sizes, *T. brasiliensis* and *Myotis sp.* are the species providing more informative prevalence values for both viral subfamilies.

sampled, and assuming a prevalence of 0.1%, as reported for a large study in Mexico and Paraguay not including submissions of suspected animals) (Sheeler-Gordon and Smith 2001), the probability of detecting a positive sample is as low as 7%. Hence, a negative result should not be interpreted as absence of infection. In accordance with this, our confidence interval for the prevalence (0.0–4.7%) includes the expected prevalence in the individuals analyzed (Sheeler-Gordon and Smith 2001). While the correlation among prevalence estimated from brain samples and from saliva swabs is not completely established (Almeida et al. 2005; Aguilar-Setien et al. 2005), our approach has the advantage of allowing long-term monitoring of the populations, because individuals can be returned to the wild wing banded for later recapture and individual identification, enabling stronger inferences on disease dynamics (Gamble et al. 2020).

For PNE assays, we used a set of degenerate oligonucleotides potentially capable to detect the diversity into the *Pneumoviridae* family; however, our study did not find PNE positive bats. To our knowledge, the only report of these viruses corresponds to a mouse MPV-related Pneumovirus, detected in *Pteropodidae* bats (Drexler et al. 2012). Although our bats are not related to the *Pteropodidae* family, there are reports of similar viruses associated with phylogenetically distant bat families (Wray et al. 2016).

Despite reporting negative results for Rhabdoviridae and Pneumoviridae, the present study contributes to set a baseline for viral circulation in bats in Uruguay and allows for longitudinal studies through wing-banding surveyed individuals.

The distribution of bat sequences across the *Herpesviridae* tree shows that the sequences analyzed belong to the subfamilies Beta- and Gamma-HV, showing high genetic diversity among them and compared with the HV sequences from other vertebrate species. In order to avoid possible sample contamination, a human strain of HV (LMM10) was included as a control. The position of this sequence in the tree as well as the other HV sequences included in the analysis clusters consistently into the Alpha-Beta- and Gamma-HV clades as reported in previous studies. Regarding the bat samples analyzed, several independent clades in both Gamma- and Beta-HV subfamilies were found, with variable divergence from other HV that cluster together. The comparison of sequence divergences among HV from insectivorous bats and with previously reported HV suggests the finding of new HV species; however, this should be confirmed with further sequencing (i.e., gB glycoprotein gene) (Wibbelt et al. 2007).

HV genetic material was detected in eight of nine bat species and at all capture sites. However, due to the latent phase in HV infections, prevalence may be underestimated since oral swabs were used for detection. Higher numbers of positive samples for Beta-HV (n = 27) in comparison with Gamma-HV (n = 20) were detected, and this bias is even more evident when analyzing only insectivorous bats

(27 and 14 positive samples, respectively (Table 2, Fig. 2 and Supplementary Tables 4–6). Overall, given the sample sizes, the most informative prevalences are those for *T. brasiliensis* and *Myotis sp*. both for Beta- and Gamma-HV (Fig. 3). Further studies are required in these two species, together with *D. rotundus* that showed a distinctive infection pattern dominated by Gamma-HV.

The samples from Rivera department, *T. brasiliensis* and *Myotis spp*., represent together the largest number of analyzed samples (43/71) corresponding to a mixed colony which roost in the dwellings of an abandoned dam and mineral processing plant, sampled in the same year (2015) (Genta et al. 2017; Botto Nuñez et al. 2018).

In this shelter, both species are found in close contact, to the extreme of pups of both species clustering together, suggesting a common nursery (Botto Nuñez et al. 2018, 2019b). This close association could be favorable for exchange of viruses, especially those present in the saliva, and this can be observed in the phylogenetic tree, where samples from both species cluster together in several clades in Beta-HV as well as in Gamma-HV subfamilies (Fig. 3). The high identity of sequences found in some viruses detected from *T. brasiliensis* and *Myotis spp.*, with 96% identity at Gamma-HV (LMM15, 42 and 39), and between 74% (LMM44 and LMM29) to 99% (LMM36, 37, 45, 38, 46, 43, and LMM 34 and LMM40) in Beta-HV could strengthen the idea of viral exchange. The phylogenetic structure of the detected viruses suggests that the association is more likely driven by ecological similarities, rather than phylogenetic closeness of the hosts.

The primer sets used in this study to amplify the polymerase gene have been extensively used for HV detection in bats, although lately they have been reported to be biased toward Gamma-HV (Anthony et al. 2015). Considering this bias, and the larger abundance of Beta-HV in that mixed colony, the distribution of positive individuals for both Beta-HV and Gamma-HV could be reflecting a pattern of coinfections. Under this assumption, it is possible that Beta-HV are widely present and that Gamma-HV positive bats might be also Beta-HV positive, with larger sharing of viruses in that colony. Further work to test for coinfections and to characterize their patterns (if present) will be needed to provide a more comprehensive ecological explanation.

Insectivorous bats show a high diversity of viruses and no phylogenetic, temporal, or geographic signal is evident when analyzing the topology of the phylogenetic tree of the HV (Fig. 2).

The viruses found in *D. rotundus*, sampled from one colony within a two years period, form an independent, strongly supported clade, in exclusion of insectivorous species (Fig. 2). This structure suggests the ecological isolation of this species, even when it can share shelters with insectivorous species in the country (Botto Nuñez et al. 2019b), something that is reinforced by the proved circulation of different rabies virus variants in insectivorous and vampire bats (Guarino et al. 2013; Botto Nuñez et al. 2019a).

It is important also to note that the migratory behavior of *T. brasiliensis* recorded in the colony (Botto Nuñez et al. 2018) can allow those bats to mix the viral communities of insectivorous bats across their migration areas. Currently available data suggest that only females of *T. brasiliensis* migrate north during winter, potentially exposing them to contact with different colonies in their wintering areas (Botto Nuñez et al. 2018). Upon return, and during the birth season, colonies of *T. brasiliensis* and *Myotis spp*. have been shown to share the roosts, even sharing nursery areas (Unpublished data). *Myotis spp*. are assumed to have in the country only local short-range movements (Unpublished data). The combination of these two species sharing roosts and the differences in migratory behavior may result in a fission/fusion dynamic for the groups that would allow for easier exchange of viruses across colonies (Gilbert et al. 2006; Olsen et al. 2006; Hill et al. 2012; Tian et al. 2015; Boulinier et al. 2016). Furthermore, these highly prevalent viruses can be used as markers to track migration routes and hence can be used to inform conservation policies for a species protected by international treaties (Hutson et al. 2001; Mickleburgh et al. 2002; Botto Nuñez et al. 2019b).

While we cannot rule out a sampling artifact, given the disbalance in species frequencies, *T. brasiliensis* appeared with significant higher prevalences, both when analyzing all HV together and when analyzing only Beta-HV infection (Supplementary Tables 4–6). The also disbalanced distribution of the species across capture sites does not allow to completely separate the effect of the host identity and the locality of capture, as most *T. brasiliensis* were sampled in Cuñapirú. While the infection and transmission dynamics of Beta- and Gamma-HV might be different, the significant effect of the age class on the total prevalence is consistent with a long-lasting infection.

These associations highlight the need to provide a comprehensive ecological background to virologic findings. Even in a country with limited knowledge of its chiropteran fauna (González and Lessa 2014; Botto Nuñez et al. 2019b),

the ecology and behavior of the bat species can contribute to the interpretation of virologic findings, and in turn, these findings can be used as tools to more in-depth studies of movement and association. This work reveals the need for more detailed studies on the virome of bats from the South American southern cone and for larger collaborative studies among disciplines.

Acknowledgements

GBN was funded by a Fulbright Graduate Scholarship and Bat Conservation International (Student Research Scholarship for Global Bat Conservation Priorities). We want to thank the collaboration of the members of the Program for Conservation of Bats from Uruguay (PCMU), and especially to Ana Laura Rodales and Enrique González for their help with the field work and the collection of samples for this study.

References

Aguilar-Setien A, Loza-Rubio E, Salas-Rojas M, Brisseau N, Cliquet F, Pastoret PP, Rojas-Dotor S, Tesoro E, Kretschmer R (2005) Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. *Epidemiol Infect* 133:517–522. https://doi.org/10.1017/S0950268805003705

Almeida MF, Martorelli LFA, Aires CC, Sallum PC, Durigon EL, Massad E (2005) Experimental rabies infection in haematophagous bats Desmodus rotundus. *Epidemiol Infect* 133:523–527. https://doi.org/10.1017/S0950268804003656

Anthony SJ, Epstein JH, Murray KA, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrelio CM, Solovyov A, Ojeda-Flores R, Arrigo NC, Islam A, Ali Khan S, Hosseini P, Bogich TL, Olival KJ, Sanchez-Leon MD, Karesh WB, Goldstein T, Luby SP, Morse SS, Mazet JAK, Daszak P, Lipkin WI (2013) A Strategy To Estimate Unknown Viral Diversity in Mammals. *Mbio*. https://doi.org/10.1128/mbio.00598-13

Anthony SJ, Islam A, Johnson C, Navarrete-Macias I, Liang E, Jain K, Hitchens PL, Che X, Soloyvov A, Hicks AL, Ojeda-Flores R, Zambrana-Torrelio C, Ulrich W, Rostal MK, Petrosov A, Garcia J, Haider N, Wolfe N, Goldstein T, Morse SS, Rahman M, Epstein JH, Mazet JK, Daszak P, Lipkin WI (2015) Non-random patterns in viral diversity. *Nat Commun* 6:8147. https://doi.org/10.1038/ncomms9147

Astorga F, Escobar LE, Poo-Muñoz DA, Medina-Vogel G (2015) Dog ownership, abundance and potential for bat-borne rabies spillover in Chile. *Prev Vet Med* 118:397–405. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.002

Beltran FJ, Dohmen FG, Del Pietro H, Cisterna DM (2014) Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in inadequate conditions. *J Infect Dev Ctries* 8:1016–1021. https://doi.org/10.3855/jidc.4136

Bordignon J, Brasil-dos-Anjos G, Bueno CR, Salvatiera-Oporto J, Davila AMR, Grisard EC, Zanetti CR (2005) Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. *Arch Virol* 150:695–708. https://doi.org/10.1007/s00705-004-0448-y

Botto Nuñez G, Becker DJ, Plowright RK (2019) The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiol Infect* 147:1–8. https://doi.org/10.1017/S0950268819000682

Botto Nuñez G, Genta M, Díaz M, Rodales AL, González EM (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 EM, Rodales AL (2019) Conservación De Los Murciélagos (Mammalia: Chiroptera) De Uruguay: Estado Actual Y Perspectivas. *Mastozoología Neotrop* 26:1–33. https://doi.org/10.31687/saremmn.19.26.1.0.05

Boulinier T, Kada S, Ponchon A, Dupraz M, Dietrich M, Gamble A, Bourret V, Duriez O, Bazire R, Tornos J, Tveraa T, Chambert T, Garnier R, McCoy KD (2016) Migration, Prospecting, Dispersal? What Host Movement Matters for Infectious Agent Circulation? In: Integrative and Comparative Biology. Oxford University Press, pp 330–342

Brook CE, Dobson AP (2015) Bats as ''special'' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol* 23:172–180. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006) Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19:531–545. https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421

Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh W, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ, Mahy BW (2000) Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288:1432–1435. https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1432

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154:171–177. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4

Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Oppong S, Sarkodie YA, Pongombo C, Lukashev AN, Schmidt-Chanasit J, Stöcker A, Carneiro AJB, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko EKV, Kruppa T, Franke CR, Kallies R, Yandoko ERN, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Krüger DH, Matthee S, Ulrich RG, Leroy EM, Drosten C (2012) Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* . https://doi.org/10.1038/ncomms1796

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340

Escobar LE, Peterson AT, Favi M, Yung V, Pons DJ, Medina-Vogel G (2013) Ecology and Geography of Transmission of Two Bat-Borne Rabies Lineages in Chile. *PLoS Negl Trop Dis*. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002577

Escobar LE, Restif O, Yung V, Favi M, Pons DJ, Medina-Vogel G (2015) Spatial and temporal trends of bat-borne rabies in Chile.

Epidemiol Infect 143:1486–1494. https://doi.org/10.1017/S095026881400226X

Gamble A, Garnier R, Chambert T, Gimenez O, Boulinier T (2020) Next-generation serology: integrating cross-sectional and capture–recapture approaches to infer disease dynamics. *Ecology* . https://doi.org/10.1002/ecy.2923

Genta M, Díaz M, Botto G (2017) Propuesta de Sitio de Importancia para la Conservación de los Murciélagos (SICOM), Usina de Cuñapirú (Dpto. Rivera, Uruguay). 1–11

Gilbert M, Xiao X, Domenech J, Lubroth J, Martin V, Slingenbergh J (2006) Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1650–1656

González EM, Lessa EP (2014) Historia de la mastozoología en Uruguay. In: Ortega J, Martínez JL, Tirira DG (eds) Historia de la mastozoología en Latinoamérica, las Guyanas y el Caribe. Editorial Murciélago Blanco y Asociación Ecuatoriana de Mastozoología, Quito y México DF, pp 381–404

González EM, Martínez-Lanfranco JA (2010) Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Vida Silvestre – Museo Nacional de Historia Natural, Ediciones de la Banda Oriental, Montevideo

Guarino H, Castilho JG, Souto J, Oliveira RN, Carrieri ML, Kotait I (2013) Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Res* 173:415–420. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.013

Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascue O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0.''. *Syst Biol* 59:307–321

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

Hayman DTS (2016) Bats as Viral Reservoirs. *Annu Rev Virol* 3:77–99. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042203

Hill NJ, Takekawa JY, Ackerman JT, Hobson KA, Herring G, Cardona CJ, Runstadler JA, Boyce WM (2012) Migration strategy affects avian influenza dynamics in mallards (Anas platyrhynchos). *Mol Ecol* 21:5986–5999. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05735.x

Hutson AM, Mickleburgh SP, Racey PA (eds) (2001) Microchiropteran bats. Global survey and conservation action plan. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group, Gland

Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, JNT, McInerney JO, (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 6:29

Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Délicat A, Paweska JT, Gonzalez J-P, Swanepoel R (2005) Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438:575–576. https://doi.org/10.1038/438575a

Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. Science (80-) 310:676–679

López-Baucells A, Rocha R, Fernández-Llamazares Á (2017) When bats go viral: Negative framings in virological research imperil bat conservation. *Mamm Rev*. https://doi.org/10.1111/mam.12110

Mickleburgh SP, Hutson AM, Racey PA (2002) A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36:18–34. https://doi.org/10.1017/S0030605301000011

Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2006) Global patterns of influenza A virus in wild birds. Science (80-.). 312:384–388

Plowright RK, Parrish CR, Mccallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham L, Lloyd-smith JO (2017) Pathways to zoonotic spillover. *Nat Rev Microbiol* 15:502–510. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45

Pozo F, Juste J, Vázquez-Morón S, Aznar-López C, Ibáñez C, Garin I, Aihartza J, Casas I, Tenorio A, Echevarría JE (2016) Identification of novel betaherpesviruses in iberian bats reveals parallel evolution. *PLoS One*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169153

R Core Team (2019) R Core Team (2019) R A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. - References - Scientific Research Publishing

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. *J Virol* 88:9819–9829. https://doi.org/10.1128/JVI.01277-14

Sheeler-Gordon LL, Smith JS (2001) Survey of Bat Populations From Mexico and Paraguay for Rabies. *J Wildl Dis* 37:582–593. https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.3.582

Tandler B (1996) Cytomegalovirus in the principal submandibular gland of the little brown bat, Myotis lucifugus. *J Comp Pathol* 114:1–9. https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80057-0

Teeling E, Vernes S, Davalos LM, Ray DA, Gilbert MTP, Myers E, Bat1K Consortium (2018) Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for all Living Bat Species. Annu Rev Anim Biosci 6:annurev–animal–022516–022811. 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

Tian H, Zhou S, Dong L, Van Boeckel TP, Cui Y, Wu Y, Cazelles B, Huang S, Yang R, Grenfell BT, Xu B (2015) Avian influenza H5N1 viral and bird migration networks in Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:172–177. https://doi.org/10.1073/pnas.1405216112

Tong S, Chern SWW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ (2008) Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *J Clin Microbiol* 46:2652–2658. https://doi.org/10.1128/JCM.00192-08

Vandevanter DR, Warrener P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM (1996) Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 34:1666–1671

Wibbelt G, Kurth A, Yasmum N, Bannert M, Nagel S, Nitsche A, Ehlers B (2007) Discovery of herpesviruses in bats. *J Gen Virol* 88:2651–2655. https://doi.org/10.1099/vir.0.83045-0

Wray AK, Olival KJ, Morán D, Lopez MR, Alvarez D, Navarrete-Macias I, Liang E, Simmons NB, Lipkin WI, Daszak P, Anthony SJ (2016) Viral Diversity, Prey Preference, and Bartonella Prevalence in Desmodus rotundus in Guatemala. *Ecohealth* 13:761–774. https://doi.org/10.1007/s10393-016-1183-z

viruses

MDPI

Article

Alphavirus Identification in Neotropical Bats

Lucía Moreira Marrero [1,2], Germán Botto Nuñez [2,3,4], Sandra Frabasile [1,*] and Adriana Delfraro [1,*]

1 Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay; lmoreira@fcien.edu.uy
2 Programa para la Conservación de los Murciélagos de Uruguay, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo 11000, Uruguay; gbotto@fmed.edu.uy
3 Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay
4 Departamento de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente, Montevideo 11600, Uruguay
* Correspondence: sfrabasile@fcien.edu.uy (S.F.); adriana@fcien.edu.uy (A.D.); Tel.: +598-25258617 (ext. 7175) (S.F. & A.D.)

Abstract: Alphaviruses (*Togaviridae*) are arthropod-borne viruses responsible for several emerging diseases, maintained in nature through transmission between hematophagous arthropod vectors and susceptible vertebrate hosts. Although bats harbor many species of viruses, their role as reservoir hosts in emergent zoonoses has been verified only in a few cases. With bats being the second most diverse order of mammals, their implication in arbovirus infections needs to be elucidated. Reports on arbovirus infections in bats are scarce, especially in South American indigenous species. In this work, we report the genomic detection and identification of two different alphaviruses in oral swabs from bats captured in Northern Uruguay. Phylogenetic analysis identified Río Negro virus (RNV) in two different species: *Tadarida brasiliensis* (n = 6) and *Myotis* spp. (n = 1) and eastern equine encephalitis virus (EEEV) in *Myotis* spp. (n = 2). Previous studies of our group identified RNV and EEEV in mosquitoes and horse serology, suggesting that they may be circulating in enzootic cycles in our country. Our findings reveal that bats can be infected by these arboviruses and that chiropterans could participate in the viral natural cycle as virus amplifiers or dead-end hosts. Further studies are warranted to elucidate the role of these mammals in the biological cycle of these alphaviruses in Uruguay.

Keywords: alphavirus; arbovirus; Chiroptera; Uruguay

check for updates

Citation: Moreira Marrero, L.; Botto Nuñez, G.; Frabasile, S.; Delfraro, A. Alphavirus Identification in Neotropical Bats. *Viruses* **2022**, *14*, 269. https://doi.org/10.3390/v14020269

Academic Editors: Jonathan Epstein and Tony Schountz

Received: 29 December 2021
Accepted: 25 January 2022
Published: 28 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Alphaviruses (*Togaviridae*) are arthropod-borne viruses associated with emerging infectious diseases of public health concern. The genus includes 32 species widely distributed throughout the world. They are single stranded, positive sense RNA, enveloped viruses. Their genome is 11–12 kilobases in size and encodes five structural proteins (C, E3, E2, 6K, and E1) and four non-structural proteins (NSP1, NSP2, NSP3, and NSP4) [1]. Most alphaviruses are mosquito-borne and are pathogenic in their vertebrate hosts and cause a wide variety of diseases in humans, ranging from febrile illness to more severe clinical symptoms, such as arthritis or encephalitis [2].

The intrinsic genetic variability and adaptability of alphaviruses, together with habitat disturbance by human activities and climate changes, are factors that may alter their ecological niche, leading to events of viral emergence or re-emergence. As recent examples, we may cite the emergence of chikungunya (CHIKV) and Mayaro viruses (MAYV) in Central and South America, or the re-emergence of Madariaga virus (MADV) in Central America [2–6].

In South America, alphaviruses from the Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) complex have been responsible for many epidemics and equine epizootics in Venezuela,

Colombia, Ecuador, Trinidad, and Peru [7,8]. MADV (eastern equine encephalitis virus complex) has been recently reported in Argentina in mosquito infections but not has yet been associated with human disease. Conversely, Rio Negro virus (RNV), which also belongs to the VEEV complex, was associated only with febrile illness in humans. It was isolated from mosquitoes and rodents, and serological studies indicate the presence of human antibodies in Argentina [9,10]. A recent serologic survey from Paraguay also reported neutralizing antibodies to this virus in the human population [11].

Alphavirus circulation in Uruguay has been detected since 1970 [12]. The presence of EEEV, VEEV, and western equine encephalitis virus (WEEV) was reported in mosquitoes, equines, and humans [12–14]. Rio Negro virus is the most geographically widespread species in the country, and its presence was confirmed by molecular detection in mosquitoes and seroprevalence studies in horses. Burgueño et al. (2018) suggest that several alphaviruses may circulate in enzootic cycles in Uruguay, with sporadic epizootic events that involve mosquitoes and vertebrates [14].

Bats (order Chiroptera) are the second most diverse mammal order in the world, after rodents [15]. Regardless of the negative public perception, bats are critical components of terrestrial ecosystems that fulfill critical roles such as arthropod suppression, pollination, seed dispersal, and forest regeneration [15–17]. They possess a set of features among mammals, including the potential to fly long distances, migratory and gregarious habits, and longevity, that make them a possible vehicle for zoonotic virus transmission than other animals [18]. In recent years, interest in bats has increased due to them being recognized as harboring many emerging and re-emerging viruses but fewer viruses than those found in rodents [19].

Some of these viruses are pathogenic for humans but do not cause overt pathology in their bat reservoir hosts [20]. However, a recent study found no differences in the number of human-infecting viruses harbored by bats and other orders of mammals and birds, when controlling for species richness [21].

Bats have long been suspected as being a reservoir for arboviruses, including alphaviruses and flaviviruses, but their contribution to arbovirus dynamics is not known and can vary widely. Some flaviviruses such as dengue virus (DENV) and West Nile virus (WNV) have been detected in bats [22,23]. Additionally, serological evidence exists supporting exposure of bats to encephalitic alphaviruses in the field, and experimental data demonstrate the susceptibility of bats to infection with alphaviruses, including VEEV [23]. Recently, molecular and cellular evidence of VEEV has been described in frugivorous bats in Colombia [24].

The transmission of virus from bats to humans or domestic animals requires several factors to be aligned, including the ecological, epidemiological, and behavioral determinants of exposure to pathogens and human factors that may affect the susceptibility of infection [25]. Natural changes in the environment, as well as those produced by human activities, promote new interactions between viruses, vectors, and mammal hosts that can promote virus infections [26,27].

In Uruguay, there are 22 recorded species of bats, belonging to Vespertilionidae, Molossidae, and Phyllostomidae families, comprising frugivorous, insectivore, and hematophagous diets [28]. Although little is known about the viruses they harbor, some studies have been published focusing on the analysis of antigenic and genetic variability of rabies virus [29], spillover events of rabies virus [30,31], and more recently, analyzing the herpesvirus infections and their ecological and conservational significance [32].

The aim of this study was the molecular detection and genetic characterization of alphaviruses in oral swabs collected from bats in Uruguay. We intended to shed light on the viral diversity in bats and, in view of the previous reports on alphavirus circulation in Uruguay, we discuss their potential ecological role in the biological cycles of these health-threatening arboviruses.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

In the present study, we re-analyzed 77 oral swabs collected in a previous study [32] from nine different bat species: *Desmodus rotundus*, *Eumops bonariensis*, *Molossops temminckii*, *Molossus*, *Molossus rufus*, *Tadarida brasiliensis*, *Eptesicus diminutus*, *Eptesicus furinalis*, and *Myotis* spp. Collections were carried out between 2013 and 2015 at five departments (Artigas, Maldonado, Montevideo, Rivera, and Rocha) of Uruguay (Figure 1, Table 1).

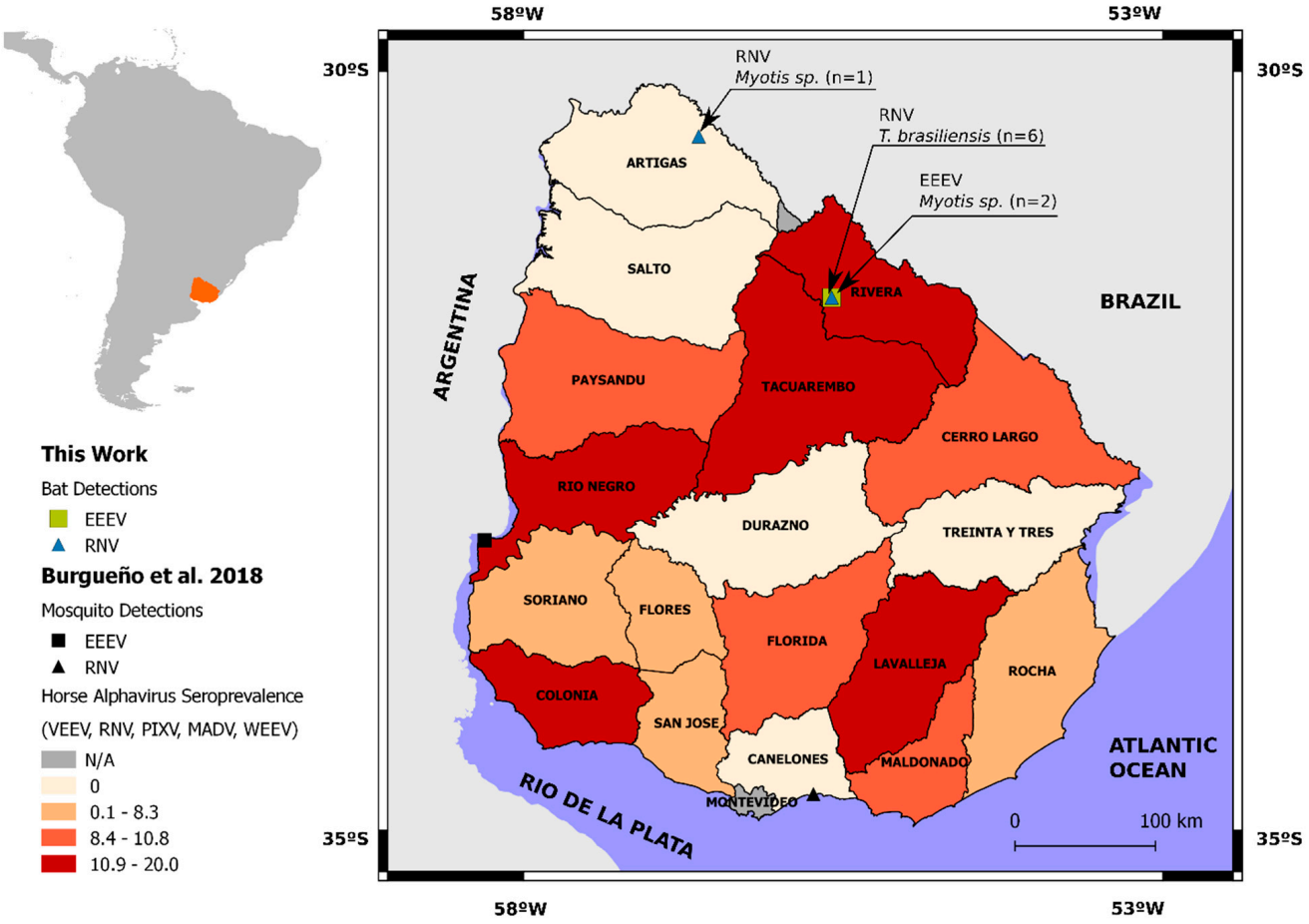


Figure 1. Geographical place of Uruguay in South America and its political division. Alphavirus seroprevalence in horses is depicted in color gradation by percentage ranks; mosquito-positive samples are depicted as ■ = EEEV and ▲ = RNV (data according to Burgueño et al., 2018). Places and number of bat sampling and alphavirus results are shown as ■ = EEEV and ▲ = RNV (this work).

Species were identified upon capture using the last available national field guide, based on external characteristics [33]. Oral swabs were placed in cryotubes with 200 µL of viral buffer (AVL® buffer from Qiagen, Hilden, Germany) and stored at room temperature before being taken to the laboratory, where they were processed immediately. After sampling, most bats were wing banded and released as part of a long-term study in the colony.

Table 1. Georeferenced locality, year, and number of bat families and species sampled.

Family	Genus and/or Species	# of Samples	Department	Georeference	Year
Molossidae	*Molossus rufus*	1	Artigas	30.23 S, 57.57 W	2013–2015
	Molossus molossus	1			
	Eumops bonariensis	1			
	Molossops temminckii	2			
Vespertilionidae	*Myotis* spp.	2			
	Eptesicus furinalis	2			
	Eptesicus diminutus	2			
Phyllostomidae	*Desmodus rotundus*	19	Maldonado	34.48 S, 54.61 W	2013
Vespertilionidae	*Eptesicus furinalis*	1	Montevideo	34.86 S, 56.20 W	2015
Molossidae	*Tadarida brasiliensis*	28	Rivera	31.52 S, 55.59 W	2015
Vespertilionidae	*Myotis* spp.	13			
Molossidae	*Molossus molossus*	3	Rocha	34.29 S, 54.06 W	2013
Vespertilionidae	*Eptesicus furinalis*	2			

2.2. Total RNA Extraction and Generic nsP4 Amplification by Reverse Transcription and Nested Polymerase Chain Reaction (RT-Nested PCR)

Total viral nucleic acids of all oral swab samples were extracted using a commercial kit QIAmp® Viral RNA (Qiagen, Hilden, Germany) according with manufacturer's instructions. Five hundred microliters of the same AVL® buffer was added to the cryotubes with the swab to complete a volume that was easy to handle. Additionally, 5.6 µL of RNA Carrier (Qiagen) was added and incubated 10 min at room temperature to continue with the manufacturer's instructions. Nucleic acid extractions were aliquoted and frozen at −80 °C until the molecular analysis.

A 195 base pair fragment of the *nsP4* gene of alphaviruses was amplified by reverse transcription (RT), followed by nested polymerase chain reaction (nested PCR) assay, according to Sanchez-Seco et al. [34]. Reverse transcription was carried out as follows: 5 µL of total RNA was mixed with 40 pmol of primer Alpha 1−(5′-CKYTCYTCIGTRTGYTTIGTICCIGG-3′), 0.2 mM of each dNTP, and 4 µL of water and incubated at 65 °C/5 min, followed by 5 min on ice. An amount of 4 µL of 5× First Stand buffer, 1 µL of DTT (0.1 M), and 1 µL of SuperScript II ™ (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was added to a final volume of 20 µL and incubated at 48 °C/60 min and 70 °C/15 min.

For first PCR round, 5 µL of cDNA was mixed with 40 pmol of each primer Alpha 1+ (5′-GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG-3′) and Alpha 1−, 5 µL of 10× PCR buffer, 1.5 µL $MgCl_2$ (50 mM), 0.2 mM of each dNTP, and 0.3 µL of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) to a final volume of 50 µL. Cycle conditions were one initial cycle of 94 °C/2 min, followed by 40 cycles of 94 °C/30 s, 52 °C/1 min and 72 °C/30 s. A final extension at 72 °C/5 min was performed.

The second PCR round was carried out in a final volume of 50 µL using 1 µL of the first-round product, mixed with 1.5 µL of $MgCl_2$ (50 mM), 0.2 mM of each dNTPs, 5 µL of 10× PCR buffer, 0.3 µL of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), and 40 pmol of each primer: Alpha 2+ (5′-GIAAYTGYAAYGTIACICARATG-3′) and Alpha 2− (5′-GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC-3′). Cycle conditions were the same as for the first round.

Two semi nested assays were performed with positive samples using a combination of primers from PCR round 1 and 2—Alpha 2+ (10 µM) with Alpha 1− (10 µM) and Alpha 1+

(10 μM) with Alpha 2− (10 μM)—to obtain a fragment of 303 bp and 372 bp, respectively. The volumes and cycles were under the same conditions as the nested PCR.

Total RNA extraction from an isolate of CHIKV was employed as a positive control. Negative controls were included in every assay. Visualization of the PCR products was performed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and stained with 1 μg/mL SybrSafe® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.3. Sequencing and Phylogenetic Analysis

PCR products of alphavirus positive samples were purified and sequenced (plus and minus strands) using 5 pmol of the same primers used for amplification, at Macrogen Inc., Seoul, Korea. Sequences were reviewed and edited with BioEdit v7.2.5 software [35] and compared with GenBank database sequences using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (Table S1). *NsP4* sequence alignments were constructed using ClustalW [36]. Sequences of the positive samples and representative sequences of the alphavirus genus retrieved from GenBank were included to build the alignments. To estimate the most suitable model of nucleotide substitution, Modelgenerator v0.85 software was used. Phylogenetic reconstruction was conducted under the maximum likelihood (ML) criterion, using PhyML v3.0 software. Statistical supports of the tree nodes were calculated by the approximate likelihood ratio test (aLRT).

2.4. Cytochrome B Assay

Bat species confirmation of the alphavirus-positive individuals was accomplished by cytochrome b analysis on the same oral swab extracts used for virus detection. PCR amplification of a 400 base-pair of the cytochrome b gene was carried out according to Martins et al. [37]. Briefly, 2 μL of each extract was mixed with 50 pmol of primers Bat 14A (5′-TATTCCCTTTGCCGGTTTACAAGACC-3′) and Bat 17A (5′-AACCTCCTAGGAGACCC AGACAATT-3′), 5 μL of 10× PCR Buffer, 1.5 μL of $MgCl_2$ (50 mM), 0.2 mM each dNTPs, and 0.2 μL of Platinum ™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) to a final volume of 50 μL. Cycle conditions were one initial cycle of 94 °C/5 min, followed by 35 cycles of 94 °C/30 s, 48 °C for 45 s, 72 °C/1:10 min, and a final step of 72 °C/10 min. Visualization of the PCR products was performed as described above. Sanger sequencing was carried out with the same PCR primers, at Macrogen Inc., Seoul, Korea.

3. Results

Seventy-seven oral swab samples from nine autochthonous species of Uruguayan bats sampled in 2013 and 2015 were analyzed to detect alphavirus. From the 77 analyzed samples, 9 were positive to alphavirus. Positive samples corresponded to two bat species: *Tadarida brasiliensis* and *Myotis* spp. from Rivera and Artigas departments. All positive samples from Rivera department were obtained from the same roost (Usina Cuñapirú) within a three-day period in 2015 (Figure 1, Tables 2 and S1).

Sequences from nested and/or semi-nested amplifications were compared with 62 alphavirus sequences of encephalitic alphaviruses from different antigenic complexes. The data set also included two sequences obtained in a previous study from mosquitoes in Uruguay (MG009261 and MG009260) [14] and other South American sequences from Argentina and Colombia. Maximum likelihood phylogeny (Figure 2) showed that seven viral sequences grouped with high statistical support (aLRT = 1) within the Rio Negro virus (RNV) clade, from the VEEV complex. The remaining two sequences clustered within lineage I eastern equine encephalitis virus, also with significant statistical support (aLRT = 1).

Table 2. Alphavirus results. Bat families and species, GenBank accession numbers for sequences, site, and year of collection.

Family	Genus/Species	Result	Sample (Lab. N°)	GB Accession Number	Department	Collection Year
Molossidae	*Tadarida brasiliensis*	RNV	26	MZ868634	Rivera	2015
	Tadarida brasiliensis	RNV	28	MZ868635	Rivera	2015
	Tadarida brasiliensis	RNV	31	MZ868637	Rivera	2015
	Tadarida brasiliensis	RNV	35	MZ890137	Rivera	2015
	Tadarida brasiliensis	RNV	38	MZ868636	Rivera	2015
	Tadarida brasiliensis	RNV	39	MZ890138	Rivera	2015
Vespertilionidae	*Myotis* spp.	RNV	11	MZ890136	Artigas	2013
	Myotis spp.	EEEV	56	MZ848197	Rivera	2015
	Myotis spp.	EEEV	61	MZ868633	Rivera	2015

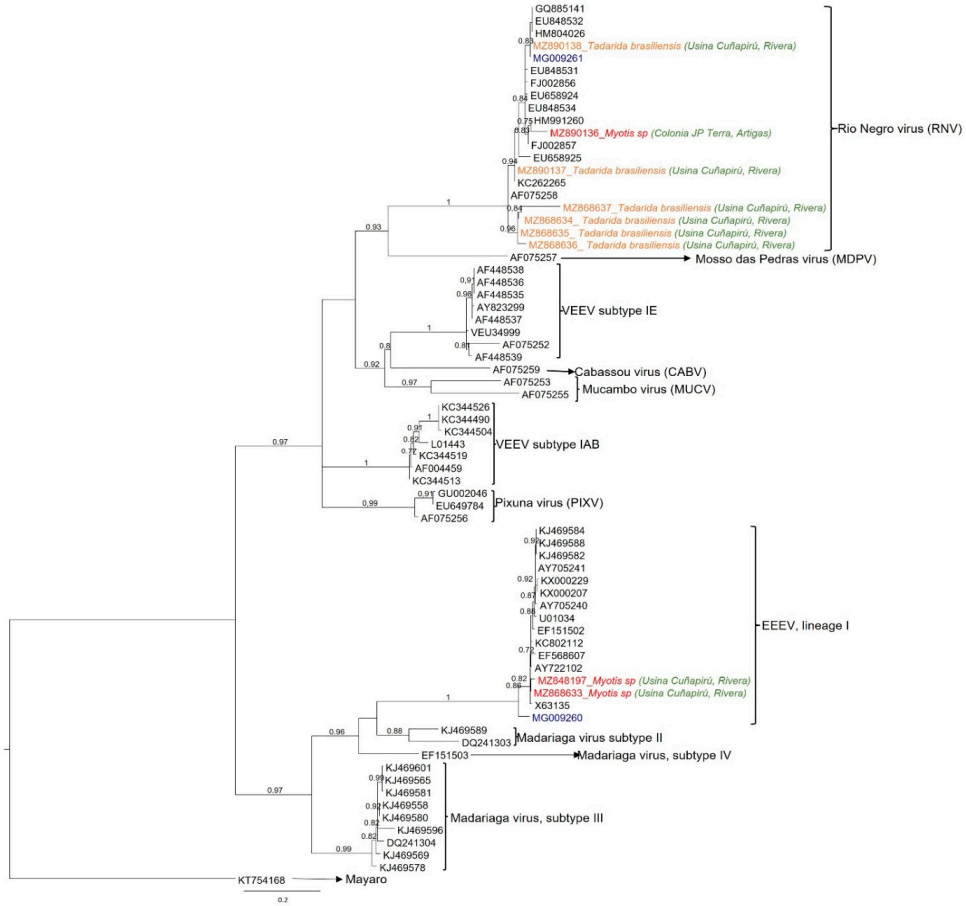


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial *nsP4* sequences. For comparison, sixty-two alphavirus sequences from different species were downloaded from GenBank, including the mosquito sequences previously reported in Uruguay (blue). Phylogeny was reconstructed under the GTR + Γ + I nucleotide substitution model. Mayaro virus was used as outgroup species. Clade supports were estimated through approximate likelihood ratio test (aLRT), and only those above 0.70 are shown. Accession numbers, bat species, and capture localities of the nine alphaviruses detected in this work are depicted in color: viruses found in *Tadarida brasiliensis*: orange; viruses found in *Myotis* spp.: red; capture sites: green; RNV and EEEV positive mosquitoes from Uruguay: blue.

Out of the seven RNV-positive samples, six were detected in *T. brasiliensis* captured in 2015 at Rivera department and one from a *Myotis* spp. sampled at Colonia J.P. Terra (Artigas department) in 2013. Both EEEV-positive samples were from *Myotis* spp. also captured in 2015 at Rivera department (Figure 1 and Table 2).

Concerning the RNV clade, four sequences retrieved from *T. brasiliensis* (MZ868634, MZ868635, MZ868636, and MZ868637) form a monophyletic subclade (aLRT = 0.96). Meanwhile, two additional RNV (MZ890137 and MZ890138) obtained also from *T. brasiliensis* were grouped in a larger subclade (aLRT = 0.94), together with RNV sequences from rodents and mosquitoes captured in Argentina. This group also included sequence MZ890136 obtained from a *Myotis* spp. collected in Artigas, over 100 km away from Usina Cuñapirú and sampled two years before. In turn, the MZ890138 sequence, clustered together (aLTR = 0.83) with a RNV sequence (MG009261) obtained from *Culex pipiens* mosquitoes collected in 2014, at 350 km South (Canelones department) (Figure 1).

Among EEEV lineage I, the two sequences MZ848197 and MZ868633, from *Myotis* spp. captured in the same year (2015) and department (Rivera), grouped together with an aLRT support of 0.82. They clustered in a highly supported group (aLTR = 1) with a North American EEEV strain (X63135) and a sequence obtained from mosquitoes collected at Rio Negro department (approximately 250 km southwest from Usina de Cuñapirú, Figure 1). A previously reported EEEV from a mosquito pool collected in Colombia (KC802112) [38] also integrated the lineage of I clade, but it was not directly related to our bat sequences.

To confirm the bat species, a cytochrome B assay was carried out using the same oral swab extracts employed to detect alphaviruses. Enough extract was available from seven of nine swabs: four corresponded to *T. brasiliensis* (samples 26, 28, 38, and 39) and three to *Myotis* spp. (samples 11, 56, and 61) (Table 2). Sequences obtained were mostly of good quality; a Blastn search analysis showed that they agreed with the bat genus/species assigned by morphological taxonomy (Table S2). The only exception was 17A sequence from sample 39 (*T. brasiliensis*), which had low quality and produced a clearly unreliable result.

4. Discussion

Bats have long been indicated as potential reservoirs for arboviruses. Serologic evidence of arboviral infection, as well as virus detection or isolation in bats, has been reported in various studies from diverse geographical regions [19,39]. Regarding alphaviruses such as EEEV and VEEV, studies come mainly from North and Central America. Most of the evidence was found in frugivorous and insectivorous bats, but there are also reports in *Myotis* spp., *Eptesicus* sp. or *Desmodus rotundus*, which are autochthonous genus/species in our country (reviewed by Fagre 2019) [23,26].

Arbovirus studies in South American bats are scarce. Two recent reports from Colombia found genome and antigen of VEEV in frugivorous bats (*Artibeus planirostris* and *Sturrnira lillium*) [24,40]. By contrast, Bittar et al. analyzed 103 individuals and did not find evidence of flavivirus or alphavirus antibodies and/or genome in bats sampled from Bahia and Sao Paulo states (Brazil), but it should be noted that, regarding serology, the hemagglutination inhibition (HI) test has lower sensitivity than plaque reduction neutralization test (PRNT) for antibody assessment [41].

In the present study we report the genomic detection and identification of two different alphaviruses in oral swabs from bats captured in Northern Uruguay. In previous studies, our group identified RNV and EEEV in mosquitoes and horse serology, suggesting that these viruses may be circulating in enzootic cycles in our country [14]. The herein reported phylogenetic analysis identified RNV in two different bat species: *T. brasiliensis* (n = 6) and *Myotis* spp. (n = 1), captured in different localities (Figures 1 and 2). This clade also included RNV from Argentina isolated from mosquitoes and rodents and from our previous finding in mosquitoes from southern Uruguay (Canelones department). Rio Negro virus sequences recovered from *T. brasiliensis* were not identical, despite having been collected from bats sharing the same shelter and sampled in a short timeframe. Only one sequence from *T.*

brasiliensis was closely related with the one identified in mosquitoes captured 350 km apart and one year before. The other five sequences were less related, and four of them clustered in a monophyletic subclade. In turn, another RNV sequence was recovered from a *Myotis* spp. captured 100 km apart (Colona J.P. Terra, Artigas department), indicating that there could be several foci of viral activity in different bat populations. At the same time, we found RNV diversity in a single bat colony (Usina de Cuñapirú). Coincidently, most of the RNV positives come from Rivera department, where the Usina de Cuñapirú colony is located, and this is one of the departments with higher horse serology to alphavirus, according to a previous report from our group (Figure 1). Taken together, these results may indicate ongoing RNV activity in this area and deserve a more in-depth study involving simultaneous mosquito and bat trapping. Our previous seroprevalence study did not show alphavirus antibodies in horses from Artigas department, but we detected a RNV positive bat in Colonia J.P. Terra (Figure 1). This may be explained by a recent introduction of the virus or by a subsampling in our former study.

Two samples from *Myotis* spp. resulted as being positive to EEEV I (lineage I), both bats belonging to the Usina de Cuñapirú colony. These sequences appear closely related in the phylogeny and cluster in a well-supported clade with North American sequences and in a Uruguayan and a Colombian sequence, both retrieved from *Culex* spp. mosquitoes. Interestingly, EEEV- and RNV-positive bats were collected in the same shelter during the same field trip. This raises the possibility of two separate arboviral cycles coexisting in different bat species that share the same shelter. Even though lineage I EEEV is enzootic only on the east coast of North America, the Caribbean, and East Central America [42,43], our finding adds to recent reports in field-caught mosquitoes in Colombia and Uruguay [14,44]. It is possible that silent circulation or sporadic introductions of this viral lineage may have occurred. EEEV can cause serious epizootic or epidemic events; thus, the former detection in mosquitoes and the present finding in a vertebrate host is suggestive and is worth further investigation.

Field identification of bats was further confirmed through cytochrome B sequencing in most positive individuals. *Tadarida brasiliensis* was confirmed at the species level; however, *Myotis* spp. was only genus-level confirmed because *Myotis* taxonomy in the southern cone is still difficult, and genetic reference sequences are scarce. As an example, recently, a new *Myotis* species was described from individuals from Uruguay with no genetic material available [45].

Samples analyzed were not subjected to virus isolation, and we were not able to obtain complete genomes. Oral swab collections were carried out directly in AVL® buffer, so virus isolation could not be achieved. In addition, samples were used to identify other viruses (herpesvirus, pneumovirus, and rhabdovirus) in a previous study [32]; thus, the remaining RNA was insufficient to attempt complete genome sequencing. This is a limitation in our study; however, we could accurately identify the viruses and obtain a reliable phylogeny, showing two alphavirus species infecting Uruguayan bats.

Evidence supporting bats as true arboviral amplifying hosts is still scarce and remains difficult to collect. To consider a particular vertebrate as an arbovirus reservoir host, several criteria should be met. These include the periodic isolation of the virus from the vertebrate in absence of seasonal vector activity and the coincidence of transmission with vector activity. Additionally, the vertebrate host must develop enough viremia (quantitatively and in time-extension) for the hematophagous arthropod to acquire an infectious bloodmeal, thus leading to virus transmission [46]. Our findings reveal that bats can be infected by the EEEV and RNV alphaviruses and that chiropterans could participate in their natural cycle, as viral amplifiers or as dead-end hosts. To address the role of these mammals in the viral cycles, additional studies are ongoing, including viral detection and blood meal analysis in mosquitoes collected in the vicinity of the colonies, together with viremia and serology in bats.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14020269/s1, Table S1, Blastn analysis of sequences from alphavirus-positive oral swabs. Table S2. Cytochrome B analysis carried on the alphavirus positive oral swabs.

Author Contributions: Conceptualization: A.D., S.F., L.M.M. and G.B.N.; laboratory experiments and data analysis: L.M.M. and A.D.; bat sampling and field identification: G.B.N.; writing—review and editing: S.F., A.D., G.B.N. and L.M.M.; funding acquisition: A.D. and S.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Universidad de la República (UdelaR) (Art. 96, statute of professors´ staff, Res. Nº 23, C.D.C.,17/XII/2019, 31/XII/2019, 10/III/2020). Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA) (CCA-Bio/ Res. 6.1-2/4/2019). L.M.M. has a master's degree scholarship from CAP-UdelaR (Postgraduate Academic Commission (exp.004090-500188-21).

Institutional Review Board Statement: The capture and manipulation of the wild animals was conducted by trained and authorized personal under two scientific capture permits issued by the National Fauna Office at the Secretary of Livestock, Agriculture and Fisheries (MGAP): case files: 176/2012 (17 August 2012) and 161/14 (4 April 2014) and in accordance with field guidelines from the American Society of Mammologists [47].

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Sequences reported in this study were submitted to GenBank with accession numbers: MZ868634, MZ868635, MZ868637, MZ890137, MZ868636, MZ890138, MZ890136, MZ848197, MZ868633, OM038093, OM038092, M038090, OM038089, OM038091, OM001113, OM001112.

Acknowledgments: We want to thank the collaboration of the members of the Program for Conservation of Bats from Uruguay (PCMU) and especially Ana Laura Rodales and Enrique González for their help with the fieldwork and the collection of samples for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Weaver, S.C.; Barrett, A.D.T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 789–801. [CrossRef] [PubMed]
2. Carrera, J.-P.; Forrester, N.; Wang, E.; Vittor, A.Y.; Haddow, A.D.; López-Vergès, S.; Abadía, I.; Castaño, E.; Sosa, N.; Báez, C.; et al. Eastern equine encephalitis in Latin America. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 732–744. [CrossRef] [PubMed]
3. Brunini, S.; França, D.D.S.; Silva, J.B.; Silva, L.N.; Silva, F.P.A.; Spadoni, M.; Rezza, G. High frequency of Mayaro virus IgM among febrile patients, central Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1025–1026. [CrossRef] [PubMed]
4. Carrera, J.P.; Cucunuba, Z.M.; Neira, K.; Lambert, B.; Pitti, Y.; Liscano, J.; Garzon, J.L.; Beltran, D.; Collado-Mariscal, L.; Saenz, L.; et al. Endemic and epidemic human alphavirus infections in eastern Panama: An analysis of population-based cross-sectional surveys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2020**, *103*, 2429. [CrossRef]
5. Nunes, M.R.T.; Faria, N.R.; de Vasconcelos, J.M.; Golding, N.; Kraemer, M.U.; de Oliveira, L.F.; da Silva Azevedo, R.d.S.; da Silva, D.E.A.; da Silva, E.V.P.; da Silva, S.P.; et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* **2015**, *13*, 102. [CrossRef]
6. Aguilar-Luis, M.A.; del Valle-Mendoza, J.; Silva-Caso, W.; Gil-Ramirez, T.; Levy-Blitchtein, S.; Bazán-Mayra, J.; Zavaleta-Gavidia, V.; Cornejo-Pacherres, D.; Palomares-Reyes, C.; del Valle, L.J. An emerging public health threat: Mayaro virus increases its distribution in Peru. *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *92*, 253–258. [CrossRef]
7. Pisano, M.B.; Contigiani, M.S.; Re, V. Venezuelan Equine Encephalitis Virus. In *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*; Liu, D., Ed.; CRC Press/Taylor & Francis.: Boca Raton, FL, USA, 2016; pp. 269–276. ISBN 9781498700375.
8. Aguilar, P.V.; Estrada-Franco, J.G.; Navarro-Lopez, R.; Ferro, C.; Haddow, A.D.; Weaver, S.C. Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: Hidden under the dengue umbrella. *Future Virol.* **2011**, *6*, 721–740. [CrossRef]
9. Pisano, M.B.; Ré, V.E.; Díaz, L.A.; Farías, A.; Stein, M.; Sanchez-Seco, M.P.; Tenorio, A.; Almirón, W.R.; Contigiani, M.S. Enzootic activity of pixuna and Rio Negro viruses (Venezuelan equine encephalitis complex) in a neotropical region of Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 199–201. [CrossRef]
10. Pisano, M.B.; Torres, C.; Ré, V.E.; Farías, A.A.; Sánchez Seco, M.P.; Tenorio, A.; Campos, R.; Contigiani, M.S. Genetic and evolutionary characterization of Venezuelan equine encephalitis virus isolates from Argentina. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *26*, 72–79. [CrossRef]
11. Cardozo, F.; Konigheim, B.; Albrieu-Llinás, G.; Rivarola, M.E.; Aguilar, J.; Rojas, A.; Quaglia, A.I.; Paez, M.; Guillén, Y.; Diaz, A.; et al. Alphaviruses: Serological Evidence of Human Infection in Paraguay (2012–2013). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 266–272. [CrossRef]

12. Somma Moreira, R.E.; Campione-Piccardo, J.; Russi, J.C.; Hortal de Giordano, M.; Bauzá, C.A.; Peluffo, G.; Tosi, H.C. Arbovirus en el Uruguay. *Arch. Pediatr. Urug.* **1970**, *41*, 359–363.
13. Delfraro, A.; Burgueño, A.; Morel, N.; González, G.; García, A.; Morelli, J.; Pérez, W.; Chiparelli, H.; Arbiza, J. Fatal Human Case of Western Equine Encephalitis, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 952. [CrossRef] [PubMed]
14. Burgueño, A.; Frabasile, S.; Díaz, L.A.; Cabrera, A.; Pisano, M.B.; Rivarola, M.E.; Contigiani, M.; Delfraro, A. Genomic characterization and seroprevalence studies on alphaviruses in Uruguay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98*, 1811–1818. [CrossRef] [PubMed]
15. Teeling, E.; Vernes, S.; Davalos, L.M.; Ray, D.A.; Gilbert, M.T.P.; Myers, E.; Bat1K Consortium. Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for all Living Bat Species. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2018**, *6*, 23–46. [CrossRef]
16. Calisher, C.H.; Childs, J.E.; Field, H.E.; Holmes, K.V.; Schountz, T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 531–545. [CrossRef]
17. López-Baucells, A.; Rocha, R.; Fernández-Llamazares, Á. When bats go viral: Negative framings in virological research imperil bat conservation. *Mamm. Rev.* **2018**, *48*, 62–66. [CrossRef]
18. Brook, C.E.; Dobson, A.P. Bats as "special" reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 172–180. [CrossRef]
19. 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.; et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proc. Biol. Sci.* **2013**, *280*, 20122753. [CrossRef]
20. O'shea, T.J.; Cryan, P.M.; Cunningham, A.A.; Fooks, A.R.; Hayman, D.T.; Luis, A.D.; Peel, A.J.; Plowright, R.K.; Wood, J.L. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 741–745. [CrossRef]
21. Mollentze, N.; Streicker, D.G. Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 9423–9430. [CrossRef]
22. Calderón, A.; Guzmán, C.; Oviedo-Socarras, T.; Mattar, S.; Rodríguez, V.; Castañeda, V.; Tadeu, L.; Figueiredo, M. Tropical Medicine and Infectious Disease Two Cases of Natural Infection of Dengue-2 Virus in Bats in the Colombian Caribbean. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2021**, *6*, 35. [CrossRef]
23. Fagre, A.C.; Kading, R.C. Can Bats Serve as Reservoirs for Arboviruses? *Viruses* **2019**, *11*, 215. [CrossRef] [PubMed]
24. Guzmán, C.; Calderón, A.; Oviedo, T.; Mattar, S.; Castañeda, J.; Rodriguez, V.; Tadeu, L.; Figueiredo, M. Molecular and cellular evidence of natural Venezuelan equine encephalitis virus infection in frugivorous bats in Colombia. *Vet. World* **2020**, *13*, 495. [CrossRef] [PubMed]
25. Plowright, R.K.; Parrish, C.R.; Mccallum, H.; Hudson, P.J.; Ko, A.I.; Graham, L.; Lloyd-smith, J.O. Pathways to zoonotic spillover. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 502–510. [CrossRef] [PubMed]
26. Sotomayor-Bonilla, J.; Abella-Medrano, C.A.; Chaves, A.; Álvarez-Mendizábal, P.; Rico-Chávez, Ó.; Ibáñez-Bernal, S.; Rostal, M.K.; Ojeda-Flores, R.; Barbachano-Guerrero, A.; Gutiérrez-Espeleta, G.; et al. Potential Sympatric Vectors and Mammalian Hosts of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in Southern Mexico. *J. Wildl. Dis.* **2017**, *53*, 657–661. [CrossRef] [PubMed]
27. 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. Land use-induced spillover: A call to action to safeguard environmental, animal, and human health. *Lancet Planet. Health* **2021**, *5*, e237–e245. [CrossRef]
28. Botto Nuñez, G.; González, E.M.; Rodales, A.L. Conservación de los murciélagos (Mammalia: Chiroptera) de Uruguay: Estado actual y perspectivas. *Mastozool. Neotrop.* **2019**, *26*, 49–64. [CrossRef]
29. Guarino, H.; Castilho, J.G.; Souto, J.; de Novaes Oliveira, R.; Carrieri, M.L.; Kotait, I. Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* **2013**, *173*, 415–420. [CrossRef]
30. Botto Nuñez, G.; Becker, D.J.; Plowright, R.K. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e180. [CrossRef]
31. Botto Nuñez, G.; Becker, D.J.; Lawrence, R.L.; Plowright, R.K. Synergistic Effects of Grassland Fragmentation and Temperature on Bovine Rabies Emergence. *Ecohealth* **2020**, *17*, 203–216. [CrossRef]
32. Moreira Marrero, L.; Botto Nuñez, G.; Malta, L.; Delfraro, A.; Frabasile, S. Ecological and Conservation Significance of Herpesvirus Infection in Neotropical Bats. *Ecohealth* **2021**, *18*, 123–133. [CrossRef] [PubMed]
33. González, E.M.; Martínez-Lanfranco, J.A. *Mamíferos de Uruguay. Guía de Campo e Introducción a su Estudio y Conservación*; Silvestre, V., Ed.; MNHN: Montevideo, Uruguay, 2010.
34. Sánchez-Seco, M.P.; Rosario, D.; Quiroz, E.; Guzmán, G.; Tenorio, A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J. Virol. Methods* **2001**, *95*, 153–161. [CrossRef]
35. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
36. Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948. [CrossRef] [PubMed]
37. Martins, F.M.; Ditchfield, A.D.; Meyer, D.; Morgante, J.S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, Desmodus rotundus (Phyllostomidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **2007**, *45*, 372–378. [CrossRef]

38. Richard Hoyos, L.; Juan Suaza, V.; Tenorio, A.; Uribe, S.; Gallego-Gómez, J. Molecular detection of Eastern Equine Encephalitis virus in mosquitoes from La Pintada (Antioquia). *Rev. MVZ Cordoba* **2015**, *20*, 4800–4806. [CrossRef]
39. Moratelli, R.; Calisher, C.H. Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 1–22. [CrossRef]
40. Guzmán, C.; Calderón, A.; Martinez, C.; Oviedo, M.; Mattar, S. Eco-epidemiology of the Venezuelan equine encephalitis virus in bats of Córdoba and Sucre, Colombia. *Acta Trop.* **2019**, *191*, 178–184. [CrossRef]
41. Bittar, C.; Machado, R.R.G.; Comelis, M.T.; Bueno, L.M.; Morielle-Versute, E.; Beguelini, M.R.; De Souza, R.P.; Nogueira, M.L.; Rahal, P. Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207010. [CrossRef]
42. Eastern Equine Encephalitis. Epidemiology & Geographic Distribution. Available online: https://www.cdc.gov/easternequineencephalitis/tech/epi.html (accessed on 29 December 2021).
43. Arrigo, N.C.; Adams, A.P.; Weaver, S.C. Evolutionary Patterns of Eastern Equine Encephalitis Virus in North versus South America Suggest Ecological Differences and Taxonomic Revision. *J. Virol.* **2010**, *84*, 1014–1025. [CrossRef]
44. Hoyos-López, R.; Suaza-Vasco, J.; Rúa-Uribe, G.; Uribe, S.; Gallego-Gómez, J.C. Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 625–634. [CrossRef] [PubMed]
45. Novaes, R.L.M.; Wilson, D.E.; Moratelli, R. A new species of Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) from Uruguay. *Vertebr. Zool.* **2021**, *71*, 711. [CrossRef]
46. Kuno, G.; Mackenzie, J.S.; Junglen, S.; Hubálek, Z.; Plyusnin, A.; Gubler, D.J. Vertebrate reservoirs of arboviruses: Myth, synonym of amplifier, or reality? *Viruses* **2017**, *9*, 185. [CrossRef]
47. Sikes, R.S. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J. Mammal.* **2016**, *97*, 663–688. [CrossRef] [PubMed]

10 Anexo

Secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos

Ensayos Coronavirus

Tabla 1 ANEXO. Secuencias utilizadas en el análisis filogenético, representativas de la subfamilia *Orthocoronavirinae* recuperadas del GenBank.

Accession numbers **(Genbank)**	**Hospedador**	**País**	**Largo de secuencia (pb)**
		Alfacoronavirus	
OP169167	*M. molossus*	Argentina, BsAs	576
OP169170.1	*T. brasiliensis*	Argentina, Río Negro	576
OP169159.1	*Molossus sp.*	Argentina, BsAs	576
OP169154.1	*T. brasiliensis*	Argentina, BsAs	576
KC110771.1	*T. brasiliensis*	Brasil	422
KC110785.1	*T. brasiliensis*	Brasil	410
KC110770.1	*T. brasiliensis*	Brasil	422
KC110780.1	*T. brasiliensis*	Brasil	422
ON256703	*Myotis sp*	Argentina, Jujuy	400
ON246265.1	*T. brasiliensis*	Argentina, Jujuy	351
ON246273.1	*R. rattus*	Argentina, Jujuy	355
ON246272	*R. rattus*	Argentina, Jujuy	350
ON246266.1	*Histiotus laephotis*	Argentina, Jujuy	351
EF544563	*M. occultus*	Montañas Rocosas, EEUU	441
EF544564	*M. occultus*	Montañas Rocosas, EEUU	420
AF353511.1	*Porcino*	Bélgica	28033
NC_009657.1	*Scotophilus sp.*	China	28203
EU375870.1	*P. pygmaeus*	Alemania	405
EU375868.1	*P. pygmaeus*	Alemania	405
OK017907	*H. pomona*	China	28151
DQ648855.1	*Murciélago*	China	425
JQ731777.1	*A. geoffroyi*	Costa Rica	816
JQ731775.1	*A. geoffroyi*	Costa Rica	816
JQ731784.1	*A. jamaicensis*	Panamá	816
JQ731786.1	*A. jamaicensis*	Panamá	816
DQ648850.1	*M. schreibersi*	China	431
DQ648835	*Murciélago*	China	420
AY518894.1	*Humano*	Países Bajos	27555
NC_002645.1	*Humano*	Alemania	27317
OP169165	*T. brasiliensis*	Argentina, Chubut	390
OP169153.1	*M. molossus*	Argentina, BsAs	390
KX094984.1	*M. molossus*	Brasil	403

ON256704.1	*Myotis sp*	Argentina, Jujuy	411
KC886321.1	*M. rufus*	Brasil	397
MH974769.1	*M. rufus*	Brasil	426
MH974764.1	*M. rufus*	Brasil	426
OM265165.1	*A. lituratus*	Brasil	438
OM265169.1	*A. lituratus*	Brasil	425
EU769558.1	*G. soricina*	Trinidad y Tobago	3905
MH974774.1	*P. discolor*	Brasil	426
OM265196.1	*P. discolor*	Brasil	374
ON228222.1	*D. rotundus*	Argentina, Jujuy	359
ON228223.1	*D. rotundus*	Argentina, Jujuy	414
EU769557.1	*C. perspicillata*	Trinidad y Tobago	5160
		Betacoronavirus	
KC886322.1	*P. davyi*	México	439
NC_003045.1	*Bovino*	-	31028
AY391777.1	*Humano*	Reino Unido	30738
AC_000192.1	*Murino*	-	31526
NC_006577	*Humano*	China	29926
MT490247.1	*M. minimus*	Filipinas	416
OM964877.1	*P.vampyrus*	Indonesia	387
AY394979.1	*Humano*	China	29645
AY572038.1	*P. larvata*	China	29683
OQ934006.1	*R. thomasi*	China	455
DQ022305.2	*R. sinicus*	China	29728
DQ648856.1	*R. ferrumequinum*	China	29704
NC_045512.2	*Humano*	China	29903
OK017908	*H. armiger*	China	31252
KX285225.1	*P. hesperidus*	Uganda	387
JX869059.2	*Humano*	-	30119
NC_009019.1	*Tylonycteris sp.*	China	30286
DQ648794.1	*T. pachypus*	China	30307
DQ648809.1	*P. abramus*	China	437
MN312687.1	*P. abramus*	China	406
DQ648819.1	*P. pipistrellus*	China	405
NC_009020.1	*Pipistrellus sp.*	China	30482
		Gammacoronavirus	
AY641576.1	*P. cristatus*	China	27434
NC_001451.1	*Aviar*	EE. UU	27608
		Deltacoronavirus	
OQ736717.1	*Porcino*	China	25360
OP355483.1	*Aviar*	Vietnam	542

Ensayos Alfavirus

Tabla 2 ANEXO. Secuencias utilizadas en el análisis filogenético, representativas de la familia *Togaviridae* recuperadas del GenBank.

Accession numbers **(Genbank)**	**Hospedador**	**País**	**Largo de secuencia (pb)**
		EEEV (linaje I)	
EF151502	*C. melanura*	EE. UU	11704
KX000069.1	*C. melanura*	EE. UU	11693
KX000066.1	*P. iliaca*	EE. UU	11679
KX000089.1	*E. caballus*	EE. UU	11689
AY722102	-	EE. UU	11680
KJ469636	-	República Dominicana	11704
X63135	-	-	11675
KJ469595	*E. caballus*	Canadá	11703
MG009260.1	*Cx. pipiens*	Uruguay	145
MZ848197	*Myotis sp.*	Uruguay	433
MZ868633	*Myotis sp.*	Uruguay	433
U01034	-	-	11678
KX000207.1	*C. melanura*	EE. UU	11695
KJ469584.1	*Aedes sp.*	EE. UU	11703
KJ469582.1	*Culiseta sp.*	EE. UU	11703
AY705240	-	EE. UU	11682
		MADV (linaje IV)	
EF151503	*Mosquitos*	Brasil	11661
		MADV (linaje III)	
KJ469596	*E. caballus*	Venezuela	11609
KJ469581	*E. caballus*	Panamá	11607
KJ469565	*E. caballus*	Panamá	11607
KJ469558	-	Brasil	11602
DQ241304.1	*Mosquitos*	Perú	11586
KJ469569	*E. caballus*	Argentina	11608
		MADV (linaje II)	
DQ241303.1	*Mosquitos*	Perú	11604
KJ469589.1	*Mesocricetus*	Guatemala	11582
		MDPV	
AF075257.1	-	Brasil	11465
		RNV	
NC_038674	*Mosquitos*	Argentina	11494
MZ868637	*T. brasiliensis*	Uruguay	270
MZ868634	*T. brasiliensis*	Uruguay	280

MZ868635	*T. brasiliensis*	Uruguay	270
MZ868636	*T. brasiliensis*	Uruguay	268
KC262265	*A. azarae*	Argentina	350
EU658925.2	*Psorophora sp.*	Argentina	174
MZ890138	*T. brasiliensis*	Uruguay	153
EU848532	*C. maxi*	Argentina	175
GQ885141	*Ae. scapularis*	Argentina	175
HM804026	*Cx. coronator*	Argentina	175
MZ890137	*T. brasiliensis*	Uruguay	149
MG009261	*Cx. pipiens*	Uruguay	192
EU848534	*Akodon sp.*	Argentina	175
EU658924.2	*Cx. coronator*	Argentina	174
EU848531	*P. cingulata*	Argentina	176
FJ002857	*Akodon sp.*	Argentina	175
HM991260	*P. varinervis*	Argentina	175
MZ890136	*Myotis sp.*	Uruguay	148
FJ002856	*Cx. mollis*	Argentina	175
		VEEV (subtipo D)	
L01443	-	Trinidad y Tobago	11446
KC344477	*H. sapiens*	Colombia	11371
KC344519	*Mansonia sp.*	Colombia	11417
AF004459.2	*E. caballus*	Venezuela	11420
KC344523	*M. auratus*	Colombia	11416
KC344521	*Mosquitos*	Colombia	11413
KC344526	*H. sapiens*	Perú	11418
KC344490	*H. sapiens*	Perú	11419
		VEEV (subtipo E)	
AF448538	*E. caballus*	México	11464
AF448539	*C. cricetus*	Guatemala	11464
		PIXV	
AF075256	-	Brasil	11344
GU002046	*Ae. aegypti*	Argentina	175
		CABV	
AF075259	-	Guyana	11385
		MUCV	
AF075253	-	Brasil	11391
AF075255	-	Perú	11311
		MAYV	
KT754168	*Haemagogus sp*	Brasil	11226