



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Caracterización genómica de cepas de coronavirus bovino circulantes en Uruguay

Tesina de Grado para la Licenciatura en Bioquímica

Sofía Gasperi

Tutora: Dra. Ana Marandino
Co-tutor: Lic. Joaquín Williman

Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Junio, 2025

Índice

Agradecimientos	3
Abreviaturas	4
Resumen	5
1. Introducción	6
1.1. RELEVANCIA DE LA ACTIVIDAD GANADERA EN URUGUAY	6
1.2. SÍNDROME DE DIARREA NEONATAL EN BOVINOS	9
1.3. LA FAMILIA CORONAVIRIDAE	10
1.3.1. GENERALIDADES DE CoVs	10
1.3.2. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN	11
1.3.3. CICLO REPLICATIVO DE LOS CoVs	12
1.3.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS CoVs	14
1.3.5. MECANISMOS EVOLUTIVOS DE LOS CoVs	16
1.3.6. HIPERVARIABILIDAD EN PROTEÍNA SPIKE (S)	18
1.4. CORONAVIRUS BOVINO	18
1.4.1 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA GENÓMICA	18
1.4.2. BCoV Y SDN	20
1.4.3. VACUNAS PARA PREVENIR INFECCIÓN POR BCoV	20
1.4.4. SALTOS INTER-ESPECIE	20
1.4.5. VARIABILIDAD DE LA PROTEÍNA S DE BCoV	21
1.4.6. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BCoV	22
1.4.7 ANÁLISIS GENÓMICOS DE BCoV	24
1.4.7.1 Metodologías NGS para secuenciación de genomas virales	24
1.4.7.2 Análisis genómicos de variantes circulantes de BCoV	26
2. Objetivos	27
2.1 OBJETIVO GENERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. Materiales y Métodos	28
3.1. MUESTRAS	28
3.2. PUESTA A PUNTO DE PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN	28
3.2.1. FILTRACIÓN DE MUESTRAS	29
3.2.2. EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN	29
3.2.3. CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	30
3.2.4. CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS	30
3.2.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS	31
3.3. APLICACIÓN DEL PROTOCOLO ESTANDARIZADO	32
4. Resultados	33
4.1. PUESTA A PUNTO DE PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN	33
4.1.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA 6084	33
4.1.2. SECUENCIACIÓN Y ENSAMBLAJE DE GENOMA DE BCoV	33
4.2. EJECUCIÓN DE PROTOCOLO ESTANDARIZADO	35
4.3. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	36
4.3.1 ENSAMBLAJE DE GENOMA DE BCoV	36

4.3.2 VARIANTES DE SECUENCIAS URUGUAYAS	36
4.3.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	40
4.3.3.1 Caracterización genética de secuencias uruguayas	40
4.3.3.2 Análisis de genomas completos	41
5. Discusión	49
5.1 ANÁLISIS GENÓMICOS EN CORONAVIRUS (CoVs)	49
5.1.1 RELEVANCIA DE ANALIZAR GENOMAS COMPLETOS	49
5.1.2 GENOMAS COMPLETOS DE BCoV	50
5.1.3 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN GENOMAS COMPLETOS DE BCoV	51
5.2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE BCoV URUGUAYAS	52
5.3 ANÁLISIS GENÓMICO DE LAS CEPAS DE BCoV URUGUAYAS	53
6. Conclusiones	56
7. Perspectivas	57
8. Bibliografía	58
9. Material suplementario	70

Agradecimientos

A todos quienes forman parte de la Sección Genética Evolutiva, por recibirme y darme la oportunidad de aprender con sus líneas de investigación. En especial a quienes fueron mis tutores en este trabajo, Ana y Joaco, y a Rúben Pérez por también orientarnos.

A Matías Castells por facilitar las muestras con las que realicé este trabajo.

A Ignacio López y Andrés Cabrera por acceder a corregir y evaluar esta tesina.

A la adorada Facultad de Ciencias, con todos sus docentes y rincones que atravesaron mi formación.

A todos los amigos que supe encontrar de paso por acá; por las sobremesas en la cantina, los parciales y exámenes que preparamos, las frustraciones compartidas, los mates (lavados), las siestas en la biblioteca, y por el siempre encuentro. Con mención especial al “cordón umbilical”, su amistad es lo más valioso que me llevo del pasaje por facultad, gracias por permitirme vivir el proceso con ustedes.

A mi psicóloga Tati, por acompañarme en encontrar las formas de transitar la vida universitaria, por las decisiones difíciles que en algún momento me ayudó a tomar.

A mis amigas desde siempre; por la incondicionalidad, por el desprejuicio, por conocernos y querernos en todas nuestras versiones, por creer más en mí de lo que yo creo.

A mis abuelos, fieles expectantes a toda hora de mi avance.

A mamá y papá, la institución más importante que formó lo que soy. Por el amor, el cuidado y todo lo que me dieron y dan sin medida. Por entender mis tiempos, errores y aciertos. Por asegurarse de que sea feliz, por priorizar mi bienestar, por inculcarme desde chica lo valioso que es poder estudiar.

A la Universidad de la República entera; la que es para todos y transforma realidades. Por dignificar, por diluir la desigualdad, por equilibrar puntos de partida, por ser oportunidad para todos, por ser justicia social.

Abreviaturas

CoV: Coronavirus

BCoV: Coronavirus bovino

HCoV-OC43: Coronavirus humano OC43

MHV: Coronavirus murino

MERS-CoV: Coronavirus del síndrome respiratorio humano de Oriente Medio

SARS-CoV: Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave humano

SDN: Síndrome de diarrea neonatal

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ADN ds: ADN de doble hebra

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNg: ARN genómico

ARNsg: ARN subgenómico

ADNasa: Desoxirribonucleasa

ORF: Marco abierto de lectura

RE: Retículo endoplasmático

ERGIC: Compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi

VDM: Vesícula de doble membrana

UTR: Región no traducida

pp1a: Producto proteico del ORF1a

pp1ab: Producto proteico del ORF1ab

RdRp: ARN polimerasa ARN dependiente

S: Spike, glicoproteína de superficie

E: Proteína de Envoltura

M: Proteína integral de Membrana

N: Proteína de Nucleocápside

HE: Hemaglutinina esterasa

nsp: Proteína no estructural

TRS: Secuencia reguladora de la transcripción

RBD: Dominio de unión al receptor celular del huésped

HVR: Región hipervariable

kDa: kiloDalton

nm: Nanometro

nM: Nanomolar

µm: Micrometro

µL: Microlitro

mL: Mililitro

ng: Nanogramo

mg: Miligramo

pb: Pares de bases

kb: kilobases

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Ct: Valor umbral de ciclo

RT: Retrotranscripción

MDA: Amplificación por desplazamiento múltiple

NGS: Secuenciación de nueva generación

MAFFT: Alineación Múltiple mediante Transformada Rápida de Fourier

PhyML: Máxima verosimilitud filogenética

RDP: Programa de detección de recombinación

IBV: virus de la bronquitis infecciosa aviar

PEDV: virus de la diarrea epidémica porcina

PBS: Buffer fosfato salino

BSA: Seroalbúmina Bovina

Resumen

El coronavirus bovino (BCoV) es uno de los principales agentes etiológicos del síndrome de diarrea neonatal (SDN) en bovinos, siendo detectado tanto en heces como en secreciones respiratorias de animales infectados. Esta enfermedad representa un desafío relevante para la salud animal y genera pérdidas económicas significativas en los sistemas de producción de carne y leche. La gran diversidad genética del BCoV, su capacidad de recombinación, cambio de huésped y emergencia de nuevas variantes, hace necesaria una vigilancia genómica constante y actualizada.

En este trabajo se estandarizó un protocolo de secuenciación de genomas completos de BCoV mediante tecnologías de secuenciación masiva (NGS), aplicándose a muestras fecales recolectadas en Uruguay entre 2017 y 2024. Como resultado, se obtuvieron y analizaron seis genomas completos de BCoV, que constituyen los primeros registros de este tipo en Sudamérica. Las secuencias fueron ensambladas, anotadas y sometidas a análisis filogenéticos tanto a nivel del genoma completo como de genes individuales, incluyendo 1a, 1b, HE, S, E, M, y N, utilizando todas las secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Los resultados filogenéticos basados en el gen S revelaron que las cepas uruguayas analizadas se agruparon en dos linajes, uno de ellos no descrito en Sudamérica hasta la fecha. Según los análisis de genomas completos, las cepas más antiguas (2017–2019) mostraron evidencia de recombinación. En cambio, las cepas más recientes (2024) se agruparon con secuencias europeas, sugiriendo una introducción reciente desde Europa Occidental. Ninguna de las cepas uruguayas mostró una relación cercana con la cepa vacunal Mebus ni con otras secuencias prototipo, lo que indica una marcada divergencia genética.

Estos hallazgos subrayan la necesidad de implementar programas de vigilancia genómica sostenida en el ganado uruguayo, con énfasis en la obtención de genomas completos. Además, el estudio demuestra el valor estratégico de incorporar tecnologías de secuenciación de nueva generación en los sistemas de diagnóstico y monitoreo molecular, permitiendo una respuesta más rápida y precisa ante enfermedades virales que afectan la producción animal y, por ende, la economía nacional.

1. Introducción

1.1. RELEVANCIA DE LA ACTIVIDAD GANADERA EN URUGUAY

Uruguay se caracteriza tanto a nivel regional como mundial por su producción cárnica y de sus derivados. Según el informe anual de comercio exterior elaborado por el organismo gubernamental Uruguay XXI, la carne bovina y los productos lácteos constituyen el segundo y cuarto producto más exportado, respectivamente, en el pasado año 2024. Dicha tendencia se mantiene en cada informe anual de los últimos 8 años (2017-2024), posicionándose la carne bovina como primero o segundo producto más exportado, y los productos lácteos dentro de los cuatro productos más exportados del país (Uruguay XXI, 2017-2024). En lo que refiere a la exportación de productos cárnicos, la carne bovina es el producto que se exporta en mayor proporción, observándose año a año en la última década que dicho producto representa más del 50% del peso de embarque. Esto hace que alrededor del 80% del monto de dinero generado por exportaciones en este rubro sean generados por carne bovina únicamente (figura 1), representando la cuarta parte de las exportaciones de bienes del país (Instituto Nacional de Carnes (a), 2023).

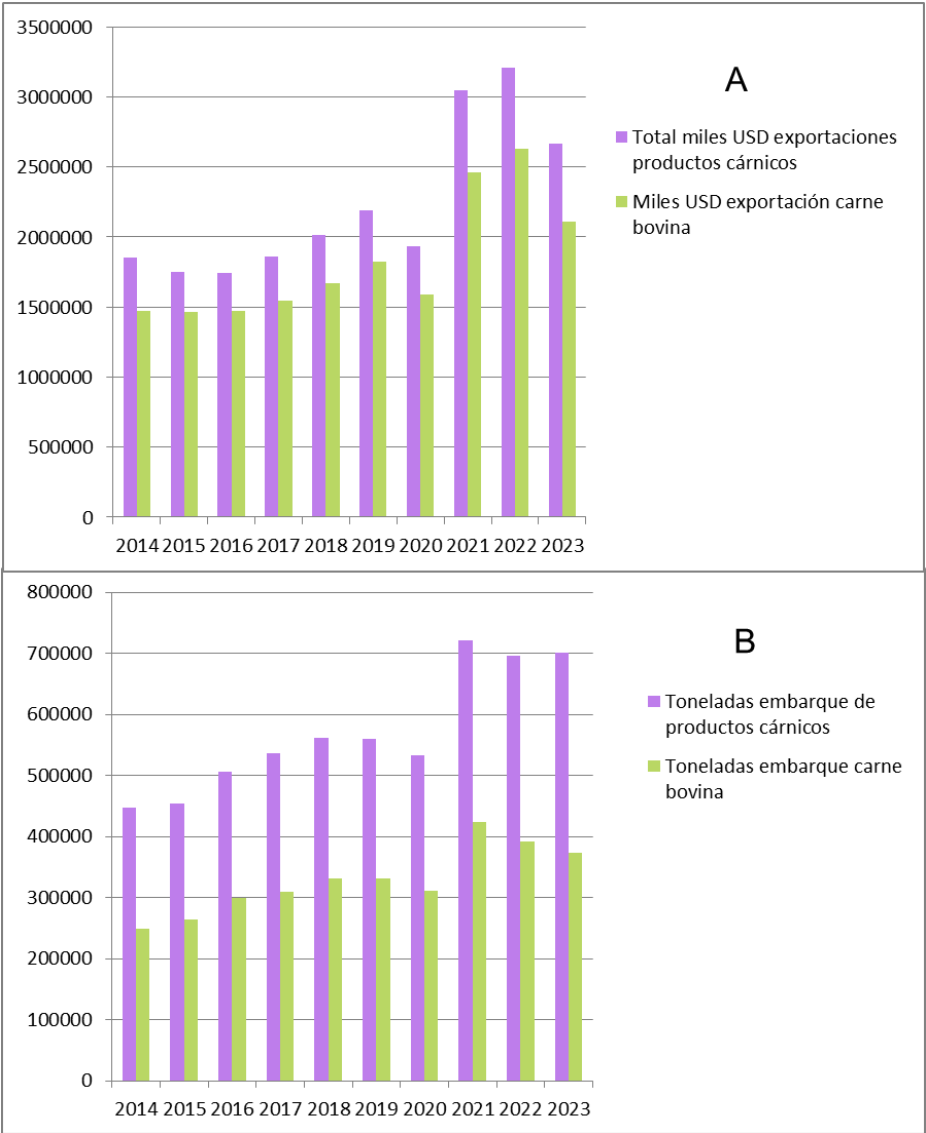


Figura 1. Proporción de peso de embarque y bienes generados de la carne bovina, en relación al total de productos cárnicos exportados por Uruguay entre los años 2014-2023. En **A)** Miles de USD generados y en **B)** Toneladas de embarque por exportaciones. Datos extraídos de Instituto Nacional de Carnes (a), 2023.

Sobre el consumo de proteína animal a nivel nacional, al año 2023 la carne bovina es la fuente más consumida por la población (45,3%), aunque con una leve tendencia a la baja desde el año 2015 por el aumento del consumo de carne aviar y porcina (Instituto Nacional de Carnes (b), 2023).

Tal volumen de exportación y consumo tienen detrás una práctica intensiva de la actividad ganadera. Según datos recolectados entre 2016 y 2023 y recuperados del Anuario Estadístico Agropecuario 2024 (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca & Oficina de Estadísticas Agropecuarias, 2024), la faena total de vacunos muestra una tendencia a ser en promedio de 2.300.000 cabezas por año. Respecto a la existencia de vacunos en el territorio, los departamentos de Tacuarembó, Cerro Largo y Florida son los tres que se destacan por albergar una mayor cantidad de ganado en su territorio, rondando el millón de cabezas cada uno. Por otro lado, en cuanto a producción lechera, los datos recolectados entre 2015 y 2023 indican un aumento en la producción de leche pero un descenso en la superficie de los tambos y la cantidad de dichos establecimientos. A su vez, el número de remitentes de leche ha decrecido drásticamente en el período 1994-2023, mientras que el volumen de leche medio diario por remitente ha crecido de forma abrupta (figura 2).

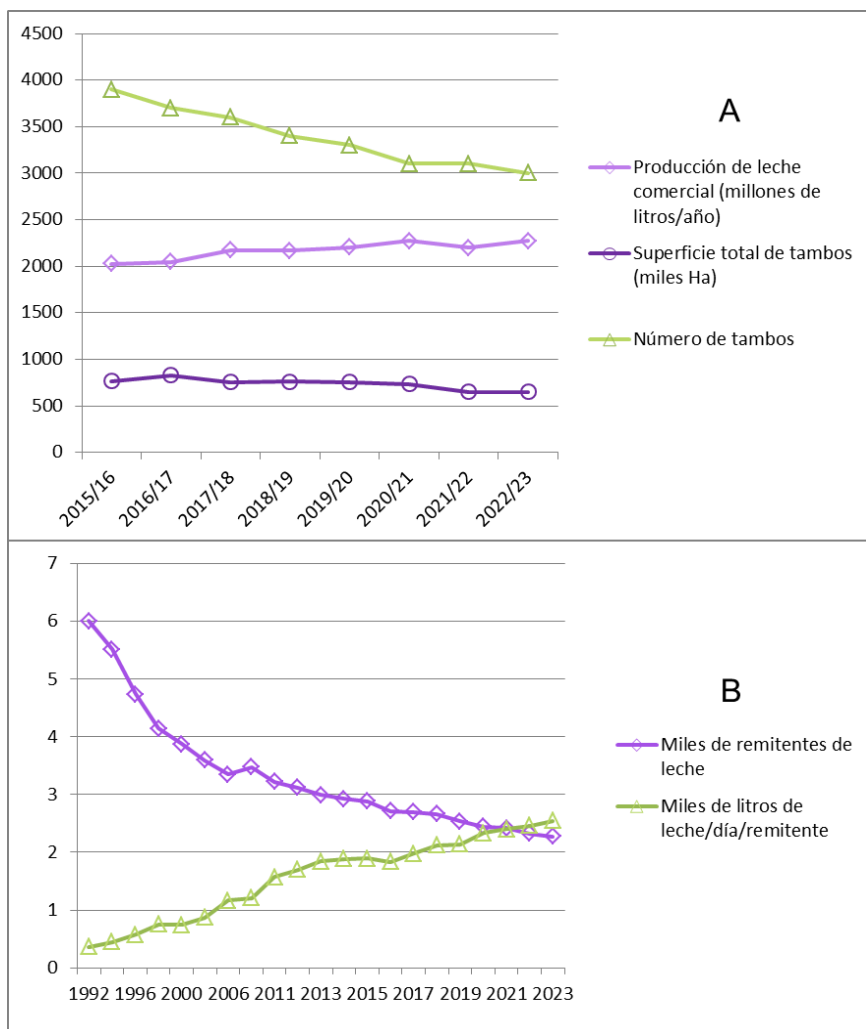


Figura 2. Variación en la capacidad productiva de los establecimientos lecheros. En **A)** Producción de leche comercial, número de tambos y su superficie total entre 2015-2023. En **B)** Cantidad de remitentes de leche y miles de litros de leche producidos por día por los mismos. Datos extraídos de Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca & Oficina de Estadísticas Agropecuarias, 2024.

Estos datos estadísticos reflejan una intensificación de la actividad ganadera en la última década. Otro factor que merece ser mencionado es la creciente relevancia que ha tomado en los últimos 20 años la actividad forestal en Uruguay y la producción de soja (*Uruguay XXI*, 2017-2024), lo cual ha incidido en el desplazamiento de la actividad ganadera de parte del territorio para dedicarlo a la misma (figura 3).

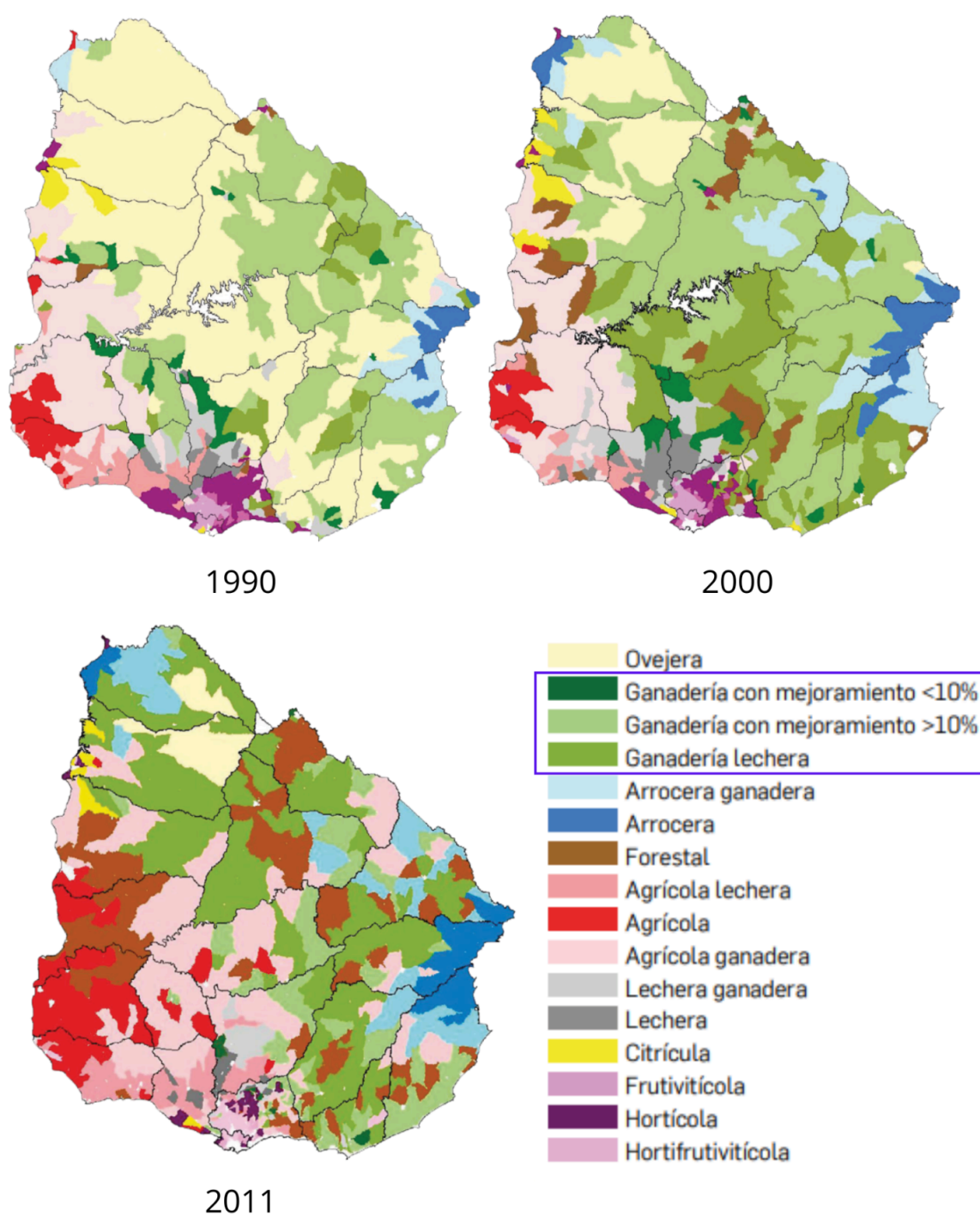


Figura 3. Dinámica del mapa geográfico de Uruguay según actividad económica entre los años 1990-2011. Tomado y modificado de Anuario Estadístico Agropecuario - Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca & Oficina de Estadísticas Agropecuarias, 2024.

El hecho de que la actividad ganadera sea llevada adelante en creces, pero destinando menos parte del territorio para ello genera un mayor contacto entre los animales. Esto genera un escenario propicio para la transmisión de enfermedades causadas por virus y bacterias. Ante esto, es fundamental mantener un programa de vigilancia para identificar qué agentes y qué variantes locales de los mismos están afectando a los animales en presente, el cual permita tomar medidas a tiempo, evitando su propagación. Conocer variantes genéticas y antigénicas circulantes de estos agentes patógenos es clave para diseñar planes de vacunación específicos, que logren de manera efectiva generar inmunidad y detener su propagación, evitando consecuencias económicas para el sector ganadero.

1.2. SÍNDROME DE DIARREA NEONATAL EN BOVINOS

El síndrome de diarrea neonatal (SDN) es una afección en bovinos que constituye un importante desafío en cuanto a salud animal en la industria ganadera, tanto en la producción de carne como en la de leche.

El SDN causa deshidratación, mala absorción de nutrientes, muerte celular de enterocitos y acidosis metabólica en los animales, y afecta más severamente a los terneros en sus primeras tres semanas de vida (Foster & Smith, 2009) causando alrededor del 75% de las muertes de bovinos en dicha franja etaria (de la Fuente et al., 1998). Cuando los animales afectados por el SDN continúan alimentándose, la función de absorción intestinal se ve sobrepasada (Nappert et al., 1993), lo cual genera una acumulación de alimento sin digerir que luego fermenta en el intestino grueso. Esto último empeora el cuadro del animal ya que se favorece el crecimiento de bacterias y la sobreproducción de ácidos orgánicos, lo cual a su vez desencadena la deshidratación, acidosis metabólica y el desbalance de electrolitos (Lewis & Phillips, 1978).

Es un síndrome multicausal, pudiendo generarse por la acción de diversos agentes infecciosos y parasitarios, individualmente o en conjunto. Dentro de estos agentes causantes del SDN se encuentran bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* y *Trueperella pyogenes*, y protozoos como *Cryptosporidium spp.* (de la Fuente et al., 1998; McGill & Sacco, 2020). Respecto a los agentes virales destacan rotavirus y coronavirus, pero también norovirus, torovirus, virus de parainfluenza tipo 3, virus respiratorio sincitial, adenovirus, reovirus, virus de la influenza D y herpesvirus 1 y 4 (de la Fuente et al., 1998; McGill & Sacco, 2020; Castells et al., 2020; Castells et al., 2024)

El tratamiento de los animales que padecen SDN resulta muy complejo debido a los diversos agentes que lo pueden estar causando.

El SDN está asociado a la actividad ganadera intensiva, donde los animales se encuentran en contacto, facilitando la propagación de agentes infecciosos (Bok et al., 2015).

Esto impacta negativamente en el desarrollo de la actividad económica del sector debido a la mortalidad, la inversión en prevención y tratamiento, la mayor susceptibilidad de los animales a otras enfermedades y la disminución en las tasas de crecimiento y/o producción de leche (Walter-Toews et al., 1986; Donovan et al., 1998; Osteras et al., 2007; Windeyer et al., 2014).

1.3. LA FAMILIA CORONAVIRIDAE

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) la familia *Coronaviridae* pertenece al suborden *Cornidovirineae*, orden *Nidovirales*, clase *Pisoniviricetes*, filo *Pisuviricota*, reino *Orthornavirae* y dominio *Riboviria*. La familia *Coronaviridae* a su vez se divide en tres subfamilias: *Letovirinae*, *Pitovirinae* y *Orthocoronavirinae*. La última subfamilia mencionada es la que comprende a los coronavirus (CoVs), clasificándolos en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gammacoronavirus* (figura 4) (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019), que incluyen los virus de mayor impacto en la salud humana y animal (Colina et al., 2021). El huésped ancestral de los CoVs pertenecientes a los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* es el murciélago, y en dichos grupos se encuentran los CoVs que afectan animales domésticos como felinos y caninos, animales de granja y rumiantes, y a los seres humanos. En cuanto a los géneros *Deltacoronavirus* y *Gammacoronavirus*, tienen su huésped ancestral en las aves (Woo et al., 2009).

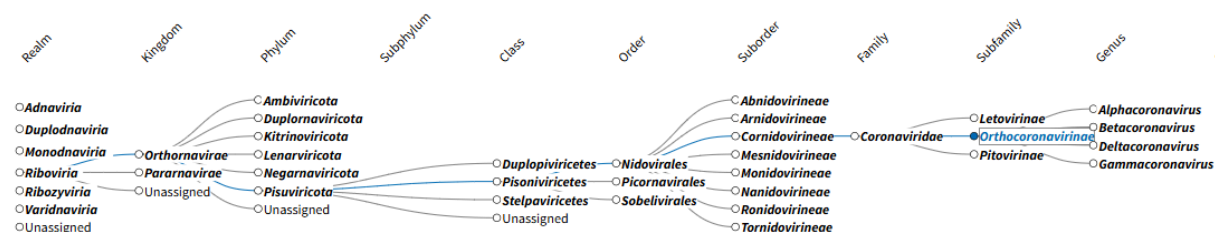


Figura 4. Clasificación taxonómica de los coronavirus. Tomado de International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019.

1.3.1. GENERALIDADES DE CoVs

Los CoVs son virus envueltos cuyo diámetro se encuentra entre los 80 y 120 nm y sus genomas consisten en una hebra de ácido ribonucleico (ARN) en sentido positivo de 27-32 kb, no segmentado, siendo una de las moléculas de ARN maduras de mayor tamaño en la naturaleza (Masters, 2006). Estructuralmente, el genoma del virus se asemeja a los ARN mensajeros eucariotas ya que posee 5'cap y 3' poli A (Colina et al., 2021).

El genoma contiene varios marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican poliproteínas esenciales para la replicación viral, específicamente *pp1a* y *pp1ab*,

traducidas a partir de los ORF1a y ORF1b, respectivamente. Además, codifica las cuatro proteínas estructurales principales: la glicoproteína Spike (S) de superficie, la proteína de la envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la nucleocápside (N). Estos ORFs siguen un orden altamente conservado entre los coronavirus: 5'-pp1a/pp1ab-S-E-M-N-3'. Asimismo, pueden existir ORFs adicionales que codifican proteínas accesorias, ubicados entre los genes estructurales (Masters, 2006). Cabe destacar que algunos grupos de coronavirus, como los Betacoronavirus, también expresan proteínas estructurales adicionales, como la hemaglutinina-esterasa (HE) en su superficie (Saif, 2010).

1.3.2. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

Los viriones de los coronavirus (CoVs) son esféricos y pleomórficos, y están rodeados por una envoltura lipídica que presenta proyecciones prominentes, correspondientes a la proteína Spike (S). Esta proteína, en forma de trímero glicosilado, media la unión al receptor celular y la fusión de membranas, siendo un factor clave en el tropismo viral (Belouzard et al., 2021). La envoltura viral está compuesta principalmente por la proteína de membrana (M), cuyos dominios hidrofóbicos contribuyen a la curvatura y estabilidad del virión. En menor proporción, la proteína de envoltura (E) también forma parte de esta estructura; actúa como canal iónico y participa en el mantenimiento del equilibrio electroquímico entre compartimentos celulares. Por su parte, la proteína de la nucleocápside (N) se une al ARN genómico, formando una nucleocápside larga y flexible (ver figura 5). Además de su rol en el empaquetamiento del genoma, la proteína N interactúa con otras proteínas estructurales para facilitar el ensamblaje y la liberación de nuevas partículas virales, y también modula procesos celulares como el ciclo celular y la traducción en la célula huésped (Payne, 2017).

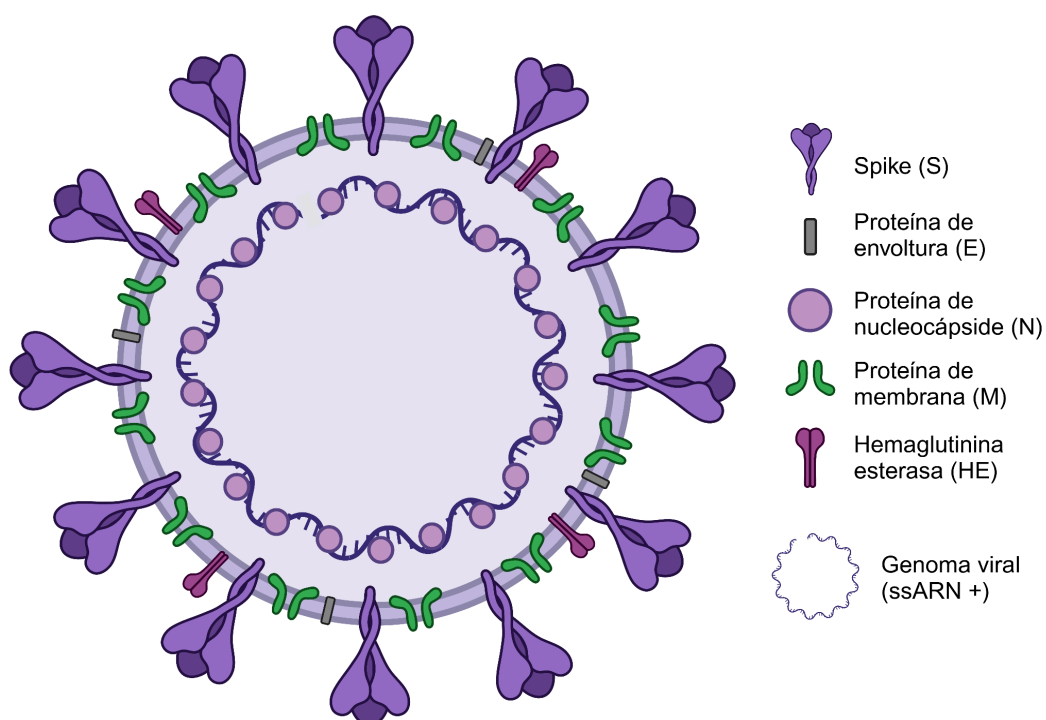


Figura 5. Estructura del virión de coronavirus. En concreto, de un CoV del género Betacoronavirus. Creado en <https://BioRender.com>.

1.3.3. CICLO REPLICATIVO DE LOS CoVs

La proteína Spike (S) desempeña un papel fundamental en el proceso de infección de la célula huésped, ya que reconoce y se une a receptores celulares específicos, y media la fusión de membranas, facilitando así la entrada del virus por vía endocítica (Yang & Leibowitz, 2015). Una vez dentro, el virus libera la nucleocápside en el citosol, permitiendo que su genoma de ARN de cadena positiva —similar al ARN mensajero (ARNm) celular— quede disponible para su traducción inmediata (Lang et al., 2021).

En el citoplasma, el genoma viral sirve como molde para la síntesis de una poliproteína replicasa, la cual es responsable de la replicación del genoma viral. A partir del ARN genómico positivo (ARNg+), esta replicasa genera tanto copias del genoma completo como una serie de ARNs subgenómicos (ARNsg), que son coterminales en el extremo 3' (Ziebuhr, 2005). Para ello, se producen intermediarios de ARN de polaridad negativa, que sirven como molde para la síntesis de los ARNs positivos funcionales (Yang & Leibowitz, 2015).

Este proceso implica que la transcripción sea discontinua, y esté mediada por interacciones ARN-ARN entre secuencias reguladoras de la transcripción (TRS). Estas secuencias se localizan tanto en el extremo 5' del genoma (TRS líder o TRS-L) como justo antes del inicio de cada gen codificante (TRS del cuerpo o TRS-B), y tienen una longitud de aproximadamente 5 a 7 nucleótidos (Graham & Baric, 2010).

Durante la síntesis de la hebra de ARN de polaridad negativa, ocurre una terminación prematura seguida de un cambio de molde hacia la región líder del genoma. En esta etapa, se forma un intermediario transcripcional compuesto por tres hebras de ARN:

- El ARN molde que contiene el TRS-B
- La hebra de ARN negativa en síntesis, que incluye la secuencia complementaria al TRS-B (cTRS-B)
- El ARN molde con el TRS-L

Para que el cambio de molde tenga lugar, debe formarse un dúplex ARN-ARN entre TRS-L (aceptor) y cTRS-B (donador) (ver figura 6). Este emparejamiento permite que la síntesis de ARN continúe a partir del TRS-L, dando lugar a ARNs subgenómicos (ARNsg) que comparten una secuencia común en el extremo 5' (líder) y una terminación 3' compartida (Sola et al., 2011).

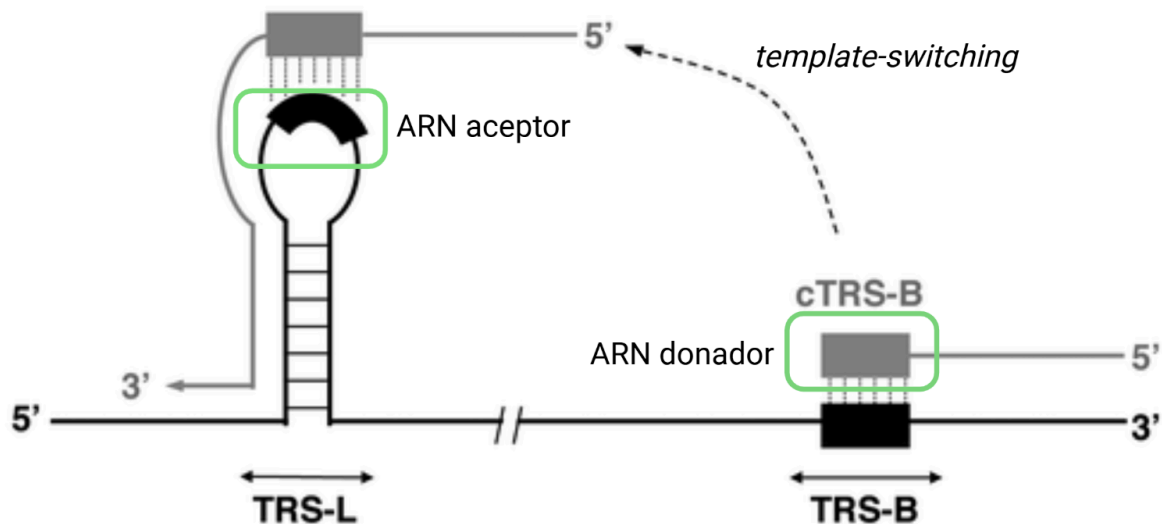


Figura 6. Esquematación del proceso de *template-switching* para generar ARNsg (-). La secuencia precedente al gen transcripto (cTRS-B, en gris) oficia de ARN donador, siendo el aceptor la secuencia TRS-L de la hebra, hacia dónde se dirige la maquinaria de transcripción para continuar allí la síntesis. Tomado y modificado de Sola et.al. 2011.

Posteriormente, a partir de los ARNsg (-) se sintetizan sus complementarios ARNsg (+). Los ARNg generados serán empaquetados en viriones.

Por otra parte, los ARNsg (+) son traducidos en las correspondientes proteínas estructurales y accesorias (Yang & Leibowitz, 2015). Las proteínas estructurales que forman parte de la envoltura del virus (S, E y M) son insertadas en el retículo endoplasmático (RE) y luego se dirigen hacia el compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi (ERGIC).

De forma paralela, la nucleocápside se ensambla mediante la asociación de las proteínas N y los ARNg (+) replicados, y se dirige hacia el ERGIC. Allí, junto con las proteínas de la envoltura, se ensamblan los viriones que posteriormente se dirigen a la membrana plasmática vía transporte vesicular (figura 7) (Masters, 2006).

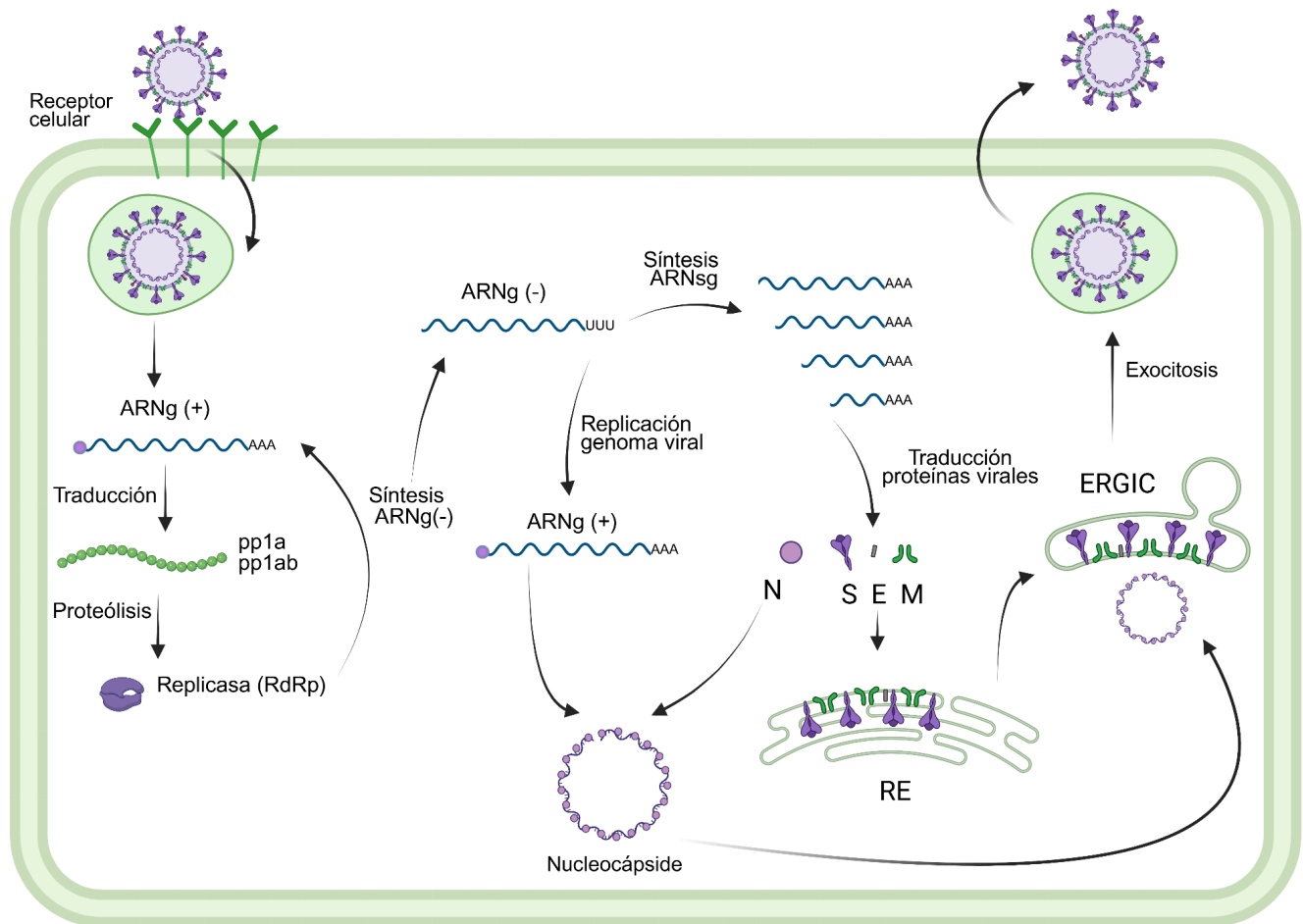


Figura 7. Ciclo replicativo de coronavirus. Creado en <https://BioRender.com>.

1.3.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS CoVs

Como es mencionado anteriormente, el genoma de los CoVs tiene características que lo asemejan a los ARNm eucariotas ya que tienen polaridad positiva, 5'-cap y 3'-poliA, sin embargo se diferencian de los mismos en que contienen múltiples ORFs (Masters, 2006).

A los extremos se encuentran las regiones no traducidas 5'-UTR y 3'-UTR, donde la primera incluye 5'-cap y la segunda 3'-poliA. Estas regiones UTR toman estructuras secundarias que resultan fundamentales para el modo de replicación del genoma mediante la síntesis discontinua de ARNs subgenómicos (ARNsg) (Yang & Leibowitz, 2015).

Los ORFs para las cuatro proteínas estructurales S, E, M y N se encuentran sobre el extremo 3', y ocupan alrededor de un tercio del genoma total; mientras que el resto del genoma codifica para la replicasa. La replicasa es codificada por dos ORFs: 1a y 1b, y es el único producto de traducción derivado directamente del genoma (Masters, 2006).

La región *upstream* ORF1a codifica la poliproteína *pp1a*, mientras que ORF1a y ORF1b codifican en conjunto a *pp1ab*. La poliproteína *pp1ab* es generada por un corrimiento de un nucleótido en sentido *upstream* (-1) en el marco abierto de lectura por parte del ribosoma (*frameshifting* ribosomal), por lo que los ORFs 1a y 1b son solapantes (Penn et al., 2020) (Masters, 2006) (Brieley et al., 1989). El ribosoma, al retroceder un nucleótido *upstream*, evita leer el codón *stop* del ORF1a y se genera entonces un péptido de mayor longitud, el cual es *pp1ab* (figura 7) (Hartenian et al., 2020).

Los productos que se generan tras el procesamiento de las mencionadas poliproteínas son las proteínas no estructurales (*nsp*): *nsp1-nsp11* a partir de *pp1a* y *pp1ab*, y *nsp12-nsp16* a partir de *pp1ab*. Las *nsp* son un grupo de proteínas que tienen actividades vinculadas a la replicación del genoma (Ziebuhr, 2005), regulación de la transcripción (Hartenian et al., 2020) y a la evasión de la respuesta inmune por parte del huésped (Low et al., 2022). En concreto, *nsp12* y *nsp13* son la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) y la helicasa, respectivamente. Por otro lado, *nsp8* también tiene actividad ARN polimerasa pero se encarga de sintetizar los cebadores para que luego *nsp12* continúe la síntesis. La proteína *nsp1* es capaz de unirse al ribosoma de la célula huésped bloqueando el canal de entrada para los ARNm celulares, evitando así su traducción, pero no así con la traducción viral ya que hay estructuras en la región 5'-UTR del genoma que inhibe a *nsp1* (Tidu et al., 2021). Las proteínas *nsp14*, *nsp15* y *nsp16* tienen un rol importante en cuanto a la fidelidad del proceso de replicación, ya que pueden procesar el ARN mediante actividad exonucleasa (ExoN), endoribonucleasa (EndoU) y metiltransferasa (MT), respectivamente (Sola et al., 2011). Sin bien las funciones de algunas de las demás *nsp* de forma individual no están del todo esclarecidas, sí hay evidencia de que disminuye la tasa de replicación en caso de deleciones de alguna de éstas (Sola et al., 2011).

El procesamiento de las poliproteínas *pp1ab* y *pp1a* para dar lugar a las 16 *nsp* es llevado por proteasas que se encuentran dentro de éstas, las cuales son *nsp3* y *nsp5*: *papaine-like* proteasa (PL^{pro}) y la *3C-like* cisteína-proteasa (3CL^{pro}), respectivamente (Shi et al., 2018). En la poliproteína, *nsp5* se encuentra flanqueada por regiones hidrofóbicas a partir de las cuales se escinde y realiza los cortes proteolíticos para liberar al resto de las *nsp* (Ziebuhr, 2005).

Entre los ORFs mencionados se presentan regiones intergénicas, u ORFs de proteínas accesorias dependiendo el género de CoV del que se trate (Masters, 2006). En la figura 8 se representa el genoma viral de CoVs de forma genérica.

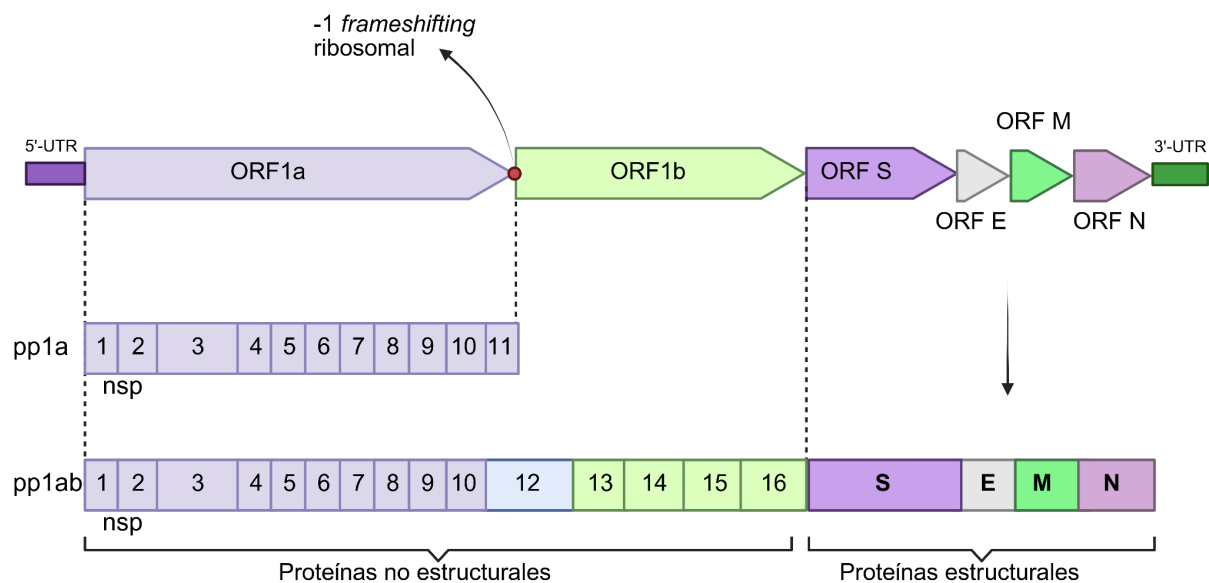


Figura 8. Esquema genérico del genoma de CoVs. Creado en <https://BioRender.com>.

1.3.5. MECANISMOS EVOLUTIVOS DE LOS CoVs

Los coronavirus (CoVs) se caracterizan por su capacidad para realizar saltos interespecie, ya sea a través de zoonosis (de animales a humanos), zoonosis reversa (de humanos a animales) o entre distintas especies animales. Esta plasticidad ha dado lugar, en las últimas cuatro décadas, a diversas enfermedades causadas por CoVs que afectan tanto a humanos como a una amplia variedad de huéspedes animales cercanos filogenéticamente, como bovinos, porcinos, caninos y felinos (Graham & Baric, 2010). Esta capacidad de cruzar barreras interespecie está estrechamente relacionada con una de las principales características evolutivas de los CoVs: su habilidad para adquirir tropismo por nuevos tejidos, adaptarse a diferentes nichos ecológicos y aumentar su transmisibilidad. Estas propiedades se deben principalmente a dos mecanismos:

- La alta tasa de mutación, consecuencia de la baja fidelidad de la ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) y del gran tamaño del genoma viral.
- La recombinación homóloga mediante cambios de molde (*template-switching*) durante la replicación (Masters, 2006; Amer, 2018; Vlasova & Saif, 2021).

Estudios *in vitro* han demostrado que polimerasas similares a la de los CoVs presentan tasas de error de entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por nucleótido por ciclo de replicación. Sin embargo, en los CoVs esta tasa se atenúa gracias a la actividad de corrección de pruebas (proofreading) de la nucleasa ExoN, codificada por la *nsp14* en el ORF1. No obstante, se ha observado que la actividad ExoN y la fidelidad de la RdRp disminuyen cuando el virus infecta un huésped alternativo, un tipo celular distinto, o en condiciones de estrés ambiental, lo que incrementa la tasa de sustitución y favorece la selección de mutaciones adaptativas (Graham & Baric, 2010).

Por otro lado, los CoVs presentan con frecuencia eventos de recombinación genética mediante recombinación homóloga (Masters, 2006; Lai, 1990; Lai & Cavanagh, 1997). Para que este proceso ocurra, es necesario que dos virus co-infecten la misma célula, lo cual implica que ambas variantes posean proteínas S compatibles con el mismo receptor celular. Durante la replicación, los ARNs genómicos (ARNg) de ambas variantes deben co-localizarse dentro de la misma vesícula de doble membrana (VDM), una estructura derivada del retículo endoplasmático que protege los genomas virales del sistema inmune (Wells et al., 2023).

Dentro de la VDM, la recombinación ocurre cuando la RdRp se encuentra transcribiendo y, al llegar a una secuencia reguladora de transcripción (TRS), se disocia del molde original, hace una pausa y luego retoma la síntesis utilizando un nuevo molde. Este proceso, facilitado por las secuencias TRS, genera un genoma de ARN quimérico, resultado del cambio de molde entre dos genomas distintos (figura 9). El ARN naciente continúa la transcripción sobre el nuevo molde, dando lugar a progenie viral recombinante (Wells et al., 2023).

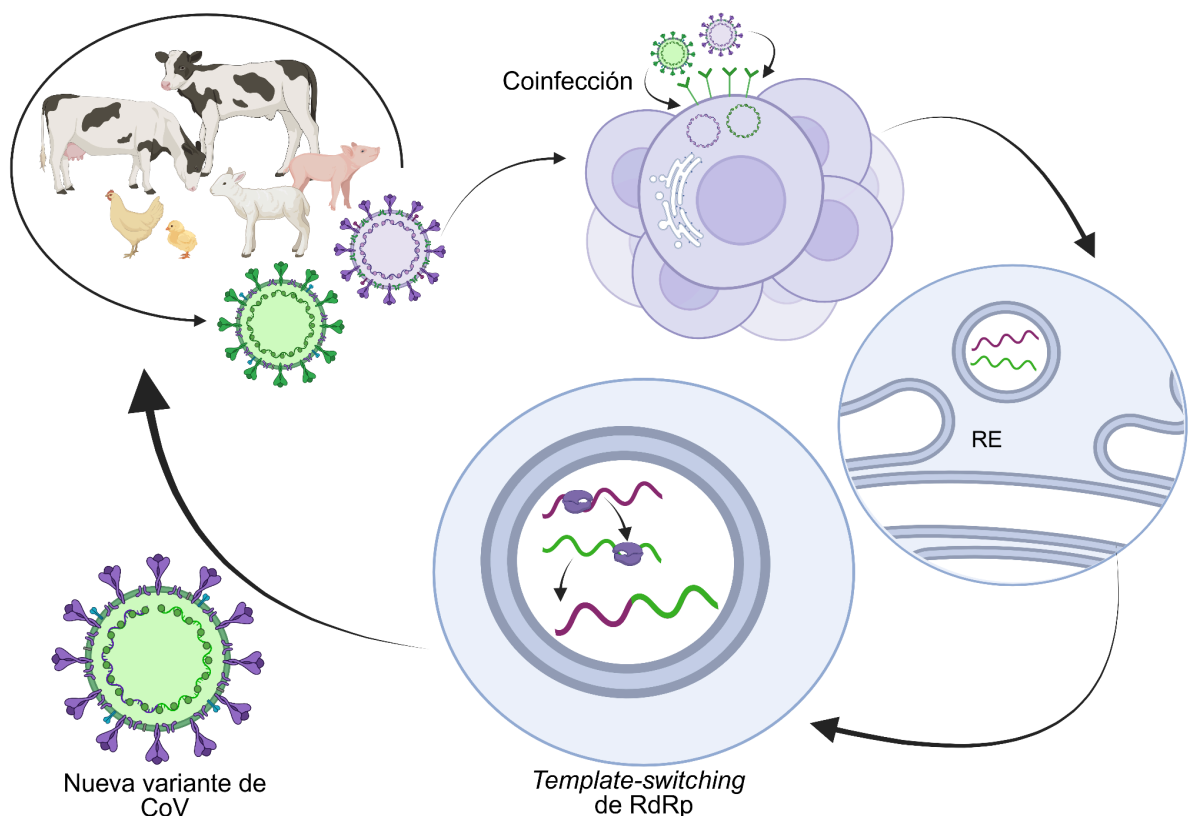


Figura 9. Esquemización de un evento de recombinación entre dos variantes genómicas de CoV, que circulan en el mismo ambiente y que coinfectan la misma célula. Creado en <https://BioRender.com>.

Como resultado de este mecanismo, se ha estimado que los CoVs pueden alcanzar frecuencias de recombinación de hasta el 25%, lo que significa que, durante una co-infección por dos variantes distintas, una de cada cuatro partículas virales progenie puede ser recombinante (Simon-Loriere & Holmes, 2011).

Estos mecanismos descritos contribuyen a la evolución del virus, permitiéndole infectar nuevos huéspedes y/o modificar su perfil antigénico, lo que facilita su replicación incluso en organismos previamente inmunizados.

1.3.6. HIPERVARIABILIDAD EN PROTEÍNA SPIKE (S)

La proteína Spike (S), que forma las características espículas en la envoltura de los coronavirus (CoVs), es una glucoproteína altamente glicosilada que se organiza en trímeros formados por tres monómeros de S. Se trata de una proteína transmembrana, con el extremo amino-terminal (N-terminal) orientado hacia el exterior del virión y el extremo carboxi-terminal (C-terminal) hacia el interior, lo que le confiere dos regiones funcionales distintas: una región hidrofílica externa (S1) y otra hidrofóbica interna (S2) (Masters, 2006).

Durante la entrada del virus a la célula huésped, la proteína S es clivada por proteasas celulares, activando sus funciones. La subunidad S1 contiene los epítopes antigénicos y el dominio de unión al receptor (RBD), siendo la encargada del reconocimiento y unión a receptores celulares específicos (Zyrianova, 2020). Por su parte, la subunidad S2 participa en la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped, permitiendo la entrada del genoma viral.

Debido a su papel en el reconocimiento inmunológico, la región S1 está sometida a una alta presión evolutiva, lo que la convierte en la región más variable del genoma de los CoVs, incluso entre cepas del mismo género o especie (Cavanagh, 1995).

1.4. CORONAVIRUS BOVINO

1.4.1 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA GENÓMICA

El Coronavirus Bovino (BCoV) pertenece a la subfamilia Orthocoronavirinae, dentro del género Betacoronavirus (Colina et al., 2021). A diferencia de otros coronavirus, los miembros de este género no solo contienen las proteínas estructurales y no estructurales comunes (descritas en la sección 1.3.4), sino que también presentan en su superficie una hemaglutinina esterasa (HE). Esta proteína facilita la infección de distintos tipos celulares al unirse al ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos que actúan como receptores celulares (Saif, 2010; Colina et al., 2021).

Según la presencia y tipo de genes accesorios en sus genomas, los betacoronavirus se agrupan en cuatro linajes filogenéticos: A, B, C y D. El BCoV se clasifica dentro del linaje A, junto con el coronavirus humano HCoV-OC43 (Russell et al., 2024) y el coronavirus murino (MHV) (Yang & Leibowitz, 2015).

Los genes accesorios corresponden a ORFs que codifican proteínas no estructurales putativas, es decir, cuya existencia se deduce a partir del marco de lectura, aunque sus productos aún no han sido aislados ni caracterizados experimentalmente. En el caso del BCoV, se han identificado cuatro ORFs adicionales que potencialmente codifican proteínas no estructurales de 32 kDa, 12,7 kDa, 4,9 kDa y 4,8 kDa, las cuales no son esenciales para la replicación viral, pero sí podrían influir en su tropismo entérico (Mounir et al., 1994).

El genoma del BCoV está organizado en siete genes, muchos de ellos con más de un ORF (Figura 10):

- ORF1a y ORF1b: codifican las poliproteínas replicasas *pp1a* y *pp1ab*.
- ORF2a y ORF2b: codifican, respectivamente, la proteína putativa NS2 de 32 kDa y la hemaglutinina esterasa (HE).
- ORF3: codifica la proteína de la espícula S.
- ORF4a y ORF4b: codifican proteínas no estructurales putativas de 4,9 kDa y 4,8 kDa.
- ORF5a y ORF5b: codifican la proteína putativa de 12,7 kDa y la proteína E, respectivamente.
- ORF6: codifica la proteína de membrana M.
- ORF7: codifica la proteína de la nucleocápside N.

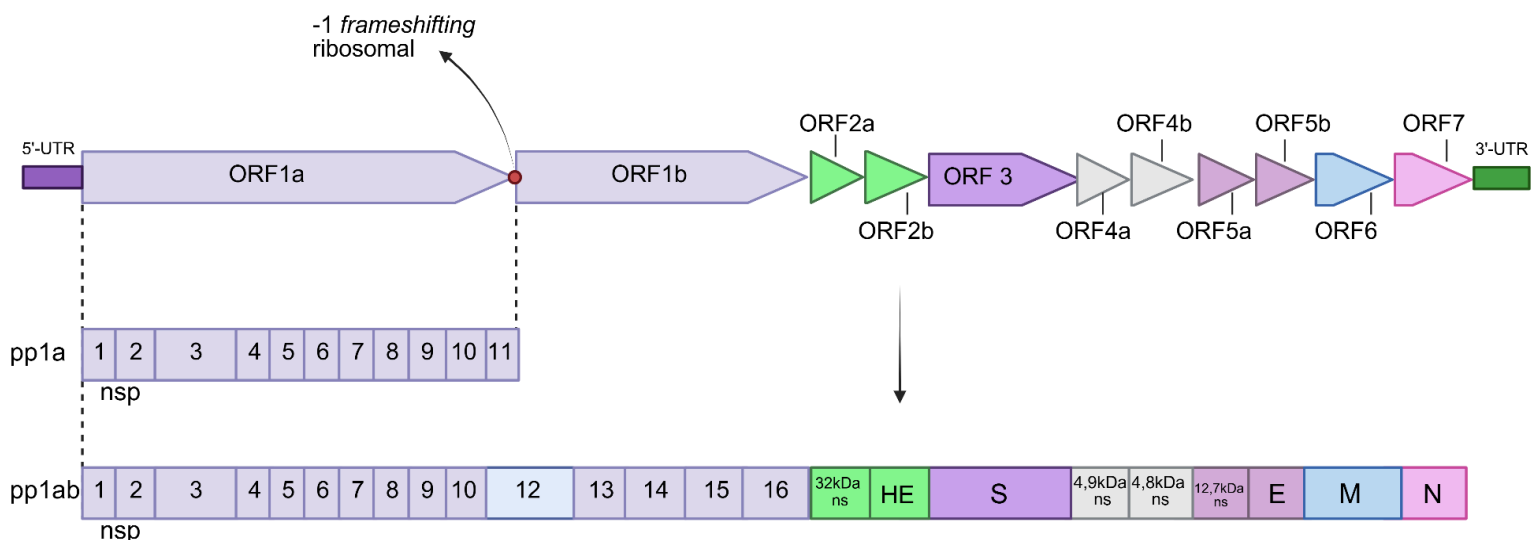


Figura 10. Organización de los marcos abiertos de lectura y sus correspondientes productos en el genoma de BCoV. Creado en <https://BioRender.com>.

1.4.2. BCoV Y SDN

El Coronavirus Bovino es el agente causal del síndrome diarreico neonatal (SDN) en terneros y de la enfermedad respiratoria bovina en animales de todas las edades (Vlasova & Saif, 2021). Se detecta tanto en las heces como en las secreciones nasales del ganado infectado. Ambas enfermedades representan las principales causas de morbilidad y mortalidad en el ganado bovino (Windeyer et al., 2014), siendo el SDN la primera causa de muerte en novillos no destetados (Urie et al., 2018).

Este virus fue aislado y caracterizado por Mebus et al. en la Universidad de Nebraska en 1973 (Mebus et al., 1972; 1973a), y rápidamente fue asociado como agente causal común del SDN (Woode et al., 1978). El virus infecta los enterocitos, se replica principalmente en el intestino delgado y se propaga hacia el intestino grueso, donde provoca diarrea malabsortiva. Los enterocitos infectados mueren por lisis celular y son sustituidos por células epiteliales intestinales inmaduras que no absorben nutrientes ni secretan enzimas digestivas de forma eficiente, lo cual genera una significativa disminución de la función metabólica del intestino (Mebus et al., 1973b).

Como se mencionó previamente, el síndrome diarreico neonatal (SDN) es una condición multifactorial que puede estar causada por uno o varios agentes infecciosos actuando de forma sinérgica. En un estudio realizado por Marsolais et al., en el que se analizaron 134 casos de SDN, se determinó que 107 correspondían a infecciones de origen viral. Dentro de estos casos, el 31% presentó infección exclusivamente por coronavirus, mientras que en el 80% se detectó coronavirus en coinfección con otros virus, como rotavirus, togavirus y herpesvirus (Marsolais et al., 1978). Estos resultados subrayan la alta prevalencia e implicancia del coronavirus bovino en los cuadros de SDN.

1.4.3. VACUNAS PARA PREVENIR INFECCIÓN POR BCoV

En Uruguay se utilizan varios productos veterinarios de uso vacunal en bovinos, con el fin de prevenir infecciones y generar inmunidad ante los agentes causantes del SDN. Estos productos incluyen cultivos inactivados de varios de estos agentes, entre los cuales se encuentra el BCoV. Según lo consultado en el portal GuíaVet (*Portal GuíaVet*, 2023), estos productos contienen la cepa de BCoV Mebus, descrita en 1972 en Nebraska, Estados Unidos (Mebus et al., 1972).

1.4.4. SALTOS INTER-ESPECIE

La actividad ganadera intensiva es un ambiente propicio para la propagación del BCoV. Por un lado, el virus se elimina por vía fecal y oral pudiendo transmitirse rápidamente al estar los animales en contacto permanentemente. A su vez, al eliminarse por vía fecal, los neonatos entran en contacto con el virus al momento de nacer si su madre está infectada (Carman & Hazlett, 1992).

Como se mencionó anteriormente, el Coronavirus Bovino (BCoV) forma parte del género Betacoronavirus, el cual también incluye otros virus como el de la

encefalomielitis hemaglutinante porcina, la hepatitis murina, el coronavirus equino, canino y humano HCoV-OC43 (Vijgen et al., 2006), así como los coronavirus humanos responsables del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV y SARS-CoV-2) (Saif, 2010; Lang et al., 2021; Li et al., 2020).

Tras las emergencias sanitarias provocadas por coronavirus en humanos ocurridas en 2003 (SARS-CoV), 2012 (MERS-CoV) (Peck et al., 2015) y especialmente la de 2019 con el SARS-CoV-2 (Li et al., 2020), el interés por estos virus ha aumentado considerablemente. Este interés ha impulsado la detección de nuevos coronavirus emergentes que afectan tanto a animales como a humanos, así como el desarrollo y mejora de estrategias diagnósticas (Amer, 2018; Colina et al., 2021).

Asimismo, se ha reconocido el papel fundamental de los animales domésticos y silvestres como reservorios naturales que favorecen la recombinación genética y la transmisión de estos virus entre especies (Colina et al., 2021). Se ha detectado gran similitud de secuencia (98-99,6%) entre los genomas de CoVs aislados de diversos rumiantes salvajes como búfalo, jirafa, antílope, venado y camélidos, respecto al genoma del BCoV tanto entérico como respiratorio (Amer, 2018; Hasoksuz et al., 2007). Estudios filogenéticos realizados con dichos genomas demuestran que existe una coevolución de los mismos, habiendo intercambio entre los distintos grupos de animales lo que lleva a infecciones interespecies (Vlasova & Saif, 2021). Los rumiantes salvajes son animales que no se caracterizan por poblar una zona geográfica en concreto, sino que están en constante movimiento en busca de pasturas, pareja y escapando de depredadores. A su vez, la actividad humana constituye un factor que presiona a estos animales a cambiar su hábitat (Amer, 2018). Esto favorece el contacto inter-específico, promoviendo la transmisión del virus de una especie a otra. El salto inter-especie es una oportunidad para el virus de generar diversidad genética y de recombinar, pudiendo divergir antigénicamente y evadir la respuesta inmune de nuevos posibles huéspedes (Vijgen et al., 2006). Esto hace que los CoVs constituyan una amenaza para la salud humana y para los sectores económicos basados en animales de producción (aviar, porcina y bovina). La divergencia genética y el origen de genomas recombinantes de CoV son eventos evolutivos que pueden ser detectados y analizados si se cuenta con la secuencia del genoma completo del virus. De aquí nace la importancia de la vigilancia genómica mediante secuenciación de genoma completo.

1.4.5. VARIABILIDAD DE LA PROTEÍNA S DE BCoV

Como se describió anteriormente, la proteína S contiene blancos antigénicos, por lo que presenta gran presión evolutiva, presentando mayor variabilidad en la región S1. En BCoV, el sitio de clivaje S1/S2 se encuentra en la posición aminoacídica 768-769 (Singasa et al., 2017). Investigaciones previas que emplearon ensayos ELISA con anticuerpos monoclonales han demostrado que la región S1 de la proteína S del BCoV

contiene cuatro dominios antigénicos independientes, denominados A, B, C y D. Entre ellos, los dominios A y B se identificaron como los principales blancos de neutralización por anticuerpos, situándose A entre los nucleótidos 972-1209 y B entre 1551-2160 (Yoo et al., 1991) Además, se observó que mutaciones introducidas en estos dominios permitieron al virus evadir dicha neutralización (Rekik & Dea, 1994; Yoo et al., 1991). Esta evidencia sugiere que la región S1 tiende a acumular cambios evolutivos con el fin de escapar de la respuesta inmune mediada por anticuerpos del huésped. Por otro lado, durante este mismo abordaje se identificó una región particularmente variable en S1, localizada dentro de la región que contiene a los dominios A y B, que se acota entre las posiciones nucleotídicas 1368 y 1776 de S (Rekik & Dea, 1994). Esta región se denominó región hipervariable (HVR) en estudios posteriores, y es utilizada para realizar análisis filogenéticos y de variabilidad entre secuencias de BCoV (Gunn et al., 2015; Hasoksuz et al., 2002).

1.4.6. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BCoV

La clasificación genética del BCoV se basa en el análisis del gen S. No obstante, hasta el momento no existe un consenso claro respecto a cuál es la región más adecuada de dicho gen para llevar a cabo esta clasificación. Diversos estudios han empleado distintas regiones del gen S para realizar análisis filogenéticos, con el objetivo de caracterizar las cepas en estudio (Liu et al., 2006; Hasoksuz et al., 2002; Suzuki et al., 2020; Singasa et al., 2017; Martínez et al., 2012; Gunn et al., 2015; Frucchi et al., 2022; Castells et al., 2019; Brandao et al., 2006; Bok et al., 2015) (tabla 1).

Tabla 1. Resumen de estudios filogenéticos de BCoV basados en regiones particulares de la proteína S.

Referencia	Región de S utilizada en análisis filogenético
Bok et al., 2015	HVR
Brandao et al., 2006	HVR
Castells et al., 2019	HVR
Frucchi et al., 2022	S1
Gunn et al., 2015	HVR
Hasoksuz et al., 2002	S1
Liu et al., 2006	S1 parcial
Martínez et al., 2012	HVR
Singasa et al., 2017	HVR
Suzuki et al., 2020	S completa

En Uruguay se realizó un exhaustivo relevamiento de BCoV en ganado lechero y de carne en once departamentos uruguayos (Castells et al., 2019). En este estudio se lograron diagnosticar más de 60 cepas de BCoV que fueron caracterizadas genéticamente mediante la región HVR del gen S. Se identificaron dos linajes genéticos distintos de BCoV en Uruguay; uno de los linajes se agrupa con cepas previamente reportadas en Argentina, mientras que el otro muestra una relación filogenética con cepas provenientes de Brasil (figura 11). Los análisis de reloj molecular estimaron que ambos linajes habrían ingresado al país en el año 2013. A nivel de secuencia, se observaron cuatro cambios aminoacídicos distintivos entre ambos linajes en la región analizada, y ambos difieren respecto a la cepa de referencia Mebus (Castells et al., 2019).

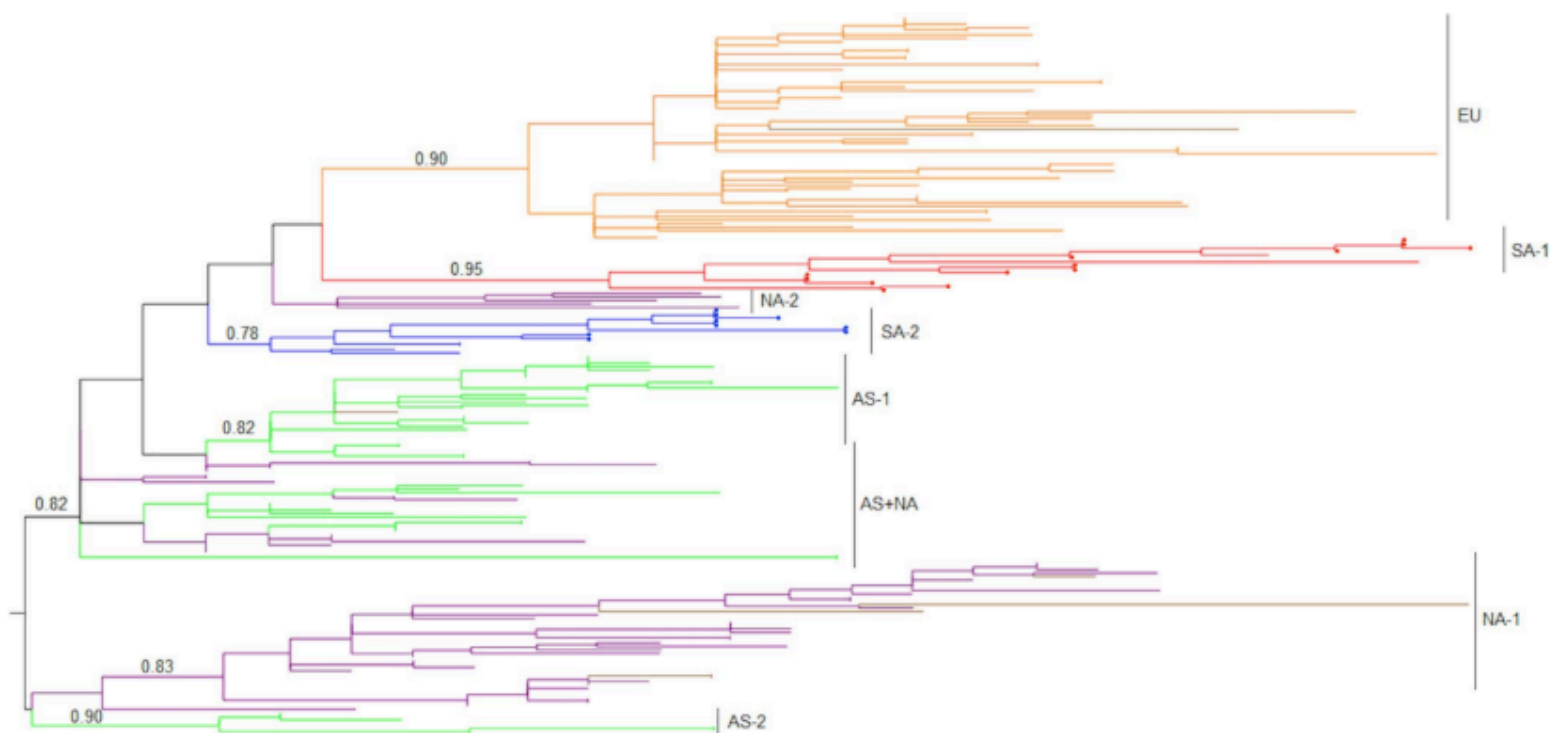


Figura 11. Análisis filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias parciales de S1 de BCoV (443 nucleótidos correspondientes a las posiciones 24984-25426 de la cepa Mebus de referencia) disponibles en la base de datos NCBI. Cepas uruguayas se identifican con círculos azules y rojos. Los linajes se denominan según el continente donde se aisló la muestra: AS= Asia; EU=Europa; NA= Norteamérica; SA=Sudamérica. Extraído de Castells et al., 2019.

Otros estudios realizados en Brasil y Argentina, utilizando la misma región genómica, arrojaron la misma conclusión respecto a la divergencia de las cepas circulantes en dichos países con la cepa de referencia Mebus, utilizada sistemáticamente para vacunar a los animales contra el virus (Brandao et al., 2006; Bok et al., 2015; Frucchi et al., 2022), por lo que todas estas conclusiones dilucidadas por las investigaciones

mencionadas permiten plantear la incógnita de si dichas vacunas realmente son efectivas.

Por esto último es de gran relevancia implementar en nuestro país un programa de vigilancia continua de la evolución genómica de este CoV que impacta sobre una de las principales actividades económicas del país. Conocer las características genómicas de las cepas circulantes generará un mayor conocimiento epidemiológico de estos patógenos que aportará datos valiosos en programas de prevención, control y mitigación de daños. Debido a su enorme diversidad, su capacidad para cambiar de huésped y la aparición constante de nuevos CoVs, el conocimiento sobre esta familia de virus requiere una actualización continua. Hasta el momento no hay disponibles secuencias del genoma completo de variantes de BCoV circulantes en Uruguay ni en el resto de Sudamérica.

1.4.7 ANÁLISIS GENÓMICOS DE BCoV

1.4.7.1 Metodologías NGS para secuenciación de genomas virales

Las nuevas metodologías de secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés) han representado un punto de inflexión en la obtención de genomas completos, incluidos los genomas virales. Su impacto se evidencia tanto en la cantidad como en la calidad de los genomas que pueden ser secuenciados, así como en la reducción significativa del tiempo requerido para ello. Estas tecnologías proporcionan herramientas avanzadas para la detección temprana de variantes genéticamente divergentes, incluso antes de su propagación, lo cual resulta fundamental para la implementación de programas de vigilancia genómica en virus. Un ejemplo particularmente ilustrativo de esta utilidad es la respuesta global ante la emergencia sanitaria provocada por la pandemia de SARS-CoV-2, en la que el acceso a tecnologías NGS y la posibilidad de secuenciar genomas completos de las variantes circulantes jugaron un papel determinante en el manejo de la crisis (Robishaw et al., 2021). Gracias a estas herramientas, en poco más de un año desde la identificación inicial del virus ya se habían secuenciado 845.000 genomas completos de SARS-CoV-2 (García-León et al., 2021), y a la fecha se encuentran disponibles más de 20.886.858 secuencias en la base de datos GISAID.

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios, necesitan una matriz celular para replicarse, lo que plantea un gran desafío técnico para secuenciar sus genomas. Los genomas virales son moléculas pequeñas en comparación al genoma de una bacteria o ADNs de células del huésped, y a su vez representan un pequeño porcentaje (2%-5%) del material genético total de la muestra metagenómica (Reyes et al., 2012). Esta diferencia depende de la matriz de la muestra biológica, ya que es más pronunciada si la muestra es, por ejemplo, un tejido, y es menor si es un fluido corporal o una suspensión. No obstante, si la muestra fuese sometida a secuenciación, la

representatividad de los genomas virales en el *output* sería muy baja (Kleiner et al., 2015). Para secuenciar genomas virales con alta cobertura y baja contaminación del huésped, es necesario la aplicación de métodos de enriquecimiento viral.

En la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias se han secuenciado genomas completos de otros CoVs, como el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) (Marandino et al., 2015, 2022, 2023; Williman, 2022) y SARS-CoV-2 (Panzera et al., 2021a, 2021b, 2022), utilizando protocolos de enfoque virómico, aislamiento viral en cultivo celular y/o huevos embrionados, y enriquecimiento de genomas virales por PCR.

- *Enfoque virómico*

Se basa en métodos físicos, químicos y/o enzimáticos que eliminan gran parte de material biológico del huésped y su microbiota de la muestra. Gracias a que las partículas virales son de menor tamaño y densidad, métodos como filtración a través de poros de 0,2-0,45 μm , o gradientes de densidad con CsCl o sacarosa excluyen de la muestra al material del huésped, aislando entonces las partículas virales (Kleiner et al., 2015; Hurwitz et al., 2013). Por otro lado, tratamientos de digestión con endonucleasas como ADNasas y ARNasas ayudan a degradar ácidos nucleicos con excepción de aquellos que se encuentran dentro de las partículas virales, por lo que los genomas virales permanecen protegidos de dicha degradación (Allander et al., 2001; Daly et al., 2011; Hall et al., 2014).

- *Aislamiento viral*

La extracción de ácidos nucleicos virales a partir de una muestra biológica con matriz sólida, como tejidos, implica la lisis celular, lo que conlleva la liberación masiva de ADN y ARN celulares. El aislamiento viral en cultivos celulares y huevos embrionados es una técnica fundamental para la propagación y estudio de virus. En cultivos celulares, la muestra viral se inocular en células susceptibles, donde la replicación viral provoca efectos citopáticos, permitiendo la posterior recolección y amplificación del virus mediante pasajes sucesivos. En huevos embrionados, la inoculación puede realizarse en diferentes cavidades, como la alantoidea, el saco vitelino o la cámara amniótica, dependiendo del virus estudiado. El virus se recupera del líquido o tejido correspondiente y se amplifica mediante pasajes repetidos, facilitando la obtención de cantidades suficientes para análisis posteriores.

- *Enriquecimiento de genomas virales por PCR*

El método de enriquecimiento de genomas virales por PCR se basa en el diseño de múltiples pares de cebadores (primers) que permitan la amplificación específica de fragmentos distribuidos a lo largo del genoma viral. Estos

fragmentos, una vez secuenciados, garantizan una cobertura adecuada y completa del genoma objetivo. Para simplificar la técnica, es fundamental que los primers sean diseñados para un ensayo de PCR múltiplex y así alcanzar una eficiencia homogénea en la amplificación de todos los fragmentos (Quick et al., 2017).

1.4.7.2 Análisis genómicos de variantes circulantes de BCoV

Hasta la fecha, se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI un total de 200 secuencias de genoma completo de BCoV, ninguna de las cuales corresponde a cepas originarias de Sudamérica. Dentro de este conjunto, se destacan tres secuencias consideradas prototipo o clásicas: Mebus (U00735) (Mebus et al., 1972), Quebec (AF220295) y Kakegawa (AB354579) (Suzuki et al., 2020; Frucchi et al., 2022).

Los genomas completos analizados fueron obtenidos mediante diversas estrategias de aislamiento y secuenciación. Las muestras colectadas en Estados Unidos, China y Japón fueron obtenidas a partir de suspensiones fecales filtradas con membranas de 0,2 μm e inoculadas en cultivos celulares de línea HRT-18 (células de tumor rectal humano) para el aislamiento de partículas virales (Alekseev et al., 2008; Hasoksuz et al., 2007; Mao et al., 2025; Suzuki et al., 2020; Byukusenge et al., 2018). En el caso de los genomas derivados de muestras irlandesas, se utilizó un protocolo similar, aunque empleando cultivos de células pulmonares fetales bovinas (Dhufaigh et al., 2022).

La metodología de secuenciación varió considerablemente entre los estudios, reflejando la evolución tecnológica a lo largo del tiempo. Por ejemplo, los genomas correspondientes a muestras recolectadas en Estados Unidos entre 1994 y 2001 fueron secuenciados con tecnología de primera generación (Sanger). Para ello se generaron amplicones mediante el diseño de pares de cebadores específicos, espaciados cada 500 pb a lo largo del genoma (Zhang et al., 2007). En contraste, los genomas más recientes fueron obtenidos mediante plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS), como Illumina MiSeq (Byukusenge et al., 2018), Ion Torrent PGM (Suzuki et al., 2020), e Illumina HiSeq2500 y NovaSeq6000 (Mao et al., 2025).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer las características genómicas de las variantes de BCoV que circulan en Uruguay.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar una técnica de secuenciación genómica de BCoV.
- Secuenciar, ensamblar y anotar genomas completos de las variantes de BCoV que se encuentran en circulación en el ganado uruguayo.
- Analizar las secuencias, caracterizarlas y compararlas con lo encontrado a nivel regional y mundial.

3. Materiales y Métodos

3.1. MUESTRAS

Se utilizaron muestras de suspensiones de materia fecal en buffer fosfato salino (PBS), colectadas de bovinos con diarrea entre los años 2017 y 2024 y con diagnóstico positivo para BCoV (tabla 2). Las mismas pertenecen al banco de muestras del Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Litoral Norte, Centro Universitario de Salto (UdelaR) que cuenta con gran experiencia en el diagnóstico y caracterización de BCoV.

Tabla 2. Datos de muestras con diagnóstico positivo para BCoV secuenciadas.

Muestra	Lugar de recolección	Fecha de recolección
5097	Colonia, Uruguay.	5/10/2017
5222	San José, Uruguay.	14/5/2019
5371	Colonia, Uruguay.	14/8/2019
6018	San José, Uruguay.	3/5/2024
6039	Colonia, Uruguay.	2/7/2024
6042	Colonia, Uruguay.	4/7/2024
6084	Colonia, Uruguay.	29/7/2024

3.2. PUESTA A PUNTO DE PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación del genoma de BCoV se empleó un enfoque virómico. En nuestro laboratorio contamos con experiencia en la aplicación de este abordaje para la secuenciación de genomas virales, utilizando diversos procedimientos que permiten incrementar la proporción de ácidos nucleicos virales en relación con los de origen bacteriano y del huésped. Entre estos métodos se incluyen el filtrado de la muestra, la digestión con nucleasas y la depleción de ARN ribosomal. Considerando la naturaleza de la muestra, se optó por aplicar un filtrado de la suspensión fecal utilizando filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm, seguido de la extracción de ARN, que incluyó un tratamiento con ADNasa dado que se trata de un virus con genoma de ARN. Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc, la construcción de librerías y la secuenciación. Como control, se analizó en paralelo la misma muestra sin el paso de filtrado para evaluar el impacto de este tratamiento en la recuperación del genoma viral.

Se utilizó la muestra 6084 para estandarizar y evaluar estos protocolos. Posteriormente, el protocolo más eficiente se aplicó al resto de las muestras.

3.2.1. FILTRACIÓN DE MUESTRAS

Considerando que los viriones de coronavirus presentan un diámetro de entre 80 y 120 nm (Masters, 2006), se evaluó la incorporación de un paso de filtrado previo a la extracción de ARN, utilizando filtros de nitrocelulosa con poros de 0,45 µm. El objetivo fue determinar si este paso permitía aumentar la proporción de genomas virales en el ARN extraído, reduciendo simultáneamente la cantidad de ARN proveniente del huésped y de otros microorganismos presentes en la muestra, como bacterias y fagos. Para ello, se tomaron 200 µL de suspensión fecal, los cuales fueron filtrados a través del filtro mencionado. Un volumen idéntico de muestra se reservó sin filtrar, con el fin de comparar posteriormente la calidad y eficiencia de la secuenciación obtenida con y sin el paso de filtrado

3.2.2. EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN

Las extracciones de ARN se realizaron usando el kit comercial *Quick-RNA Miniprep* (Zymo Research, Estados Unidos) partiendo de 200 µL de muestra y siguiendo las instrucciones del fabricante, realizando además el paso opcional de digestión de ADN por desoxirribonucleasa (ADNasa).

Posteriormente, el ARN fue sometido a retrotranscripción (RT) para obtener ADN complementario (ADNc) simple hebra con la enzima *RT EPH3* de Illumina (Illumina, Estados Unidos), utilizando 8,5 µL de random primers, 8,5 µL de la extracción de ARN previamente realizada y siguiendo especificaciones del fabricante.

Para controlar los procedimientos hasta aquí realizados, se realizó una PCR en tiempo real (qPCR) a partir de 1 µL del ADNc, mediante la amplificación de un fragmento conservado de 85 pb en el gen M utilizando un par de cebadores y una sonda de hidrólisis diseñados y reportados por Decaro et al., 2008 (tabla 3), y el kit *Ultimate HotRox Master Mix, Low ROX* (BIORON, Alemania).

Tabla 3. Secuencia de cebadores y sonda de hidrólisis utilizados para amplificar fragmento de 85 pb del gen M de BCoV, para su detección mediante qPCR. Diseñados y reportados por Decaro et al., 2008. FAM: 6-carboxifluoresceína. BHQ1: *black hole quencher* 1.

Cebador/sonda	Secuencia 5'-->3'
BCoV - Cebador <i>Forward</i>	CTGGAAGTTGGTGGAGTT
BCoV - Cebador <i>Reverse</i>	ATTATCGGCCTAACATACATC
Sonda de hidrólisis	FAM-CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT-BHQ1

Finalmente, con el objetivo de obtener ADN de doble hebra necesario como insumo para la construcción de librerías compatibles con la plataforma Illumina, se llevó a cabo una amplificación por desplazamiento múltiple (MDA). Esta técnica de amplificación isotérmica emplea la ADN polimerasa $\Phi 29$ (phi29), caracterizada por su alta fidelidad y capacidad de desplazamiento de cadena. Para ello, se utilizó la enzima phi29 provista

por *New England Biolabs* (NEB, Reino Unido), en un volumen final de 25 μL , utilizando 16,4 μL del ADNc previamente sintetizado. La reacción de MDA consiste en un primer paso de desnaturalización del ADN (3 minutos a 95°C), donde el mismo se incuba junto con el buffer de la enzima, random primers exo-resistentes con 2-fosforotioato unido al extremo 3' y dNTPs. El segundo paso se basa en la amplificación del ADN, para lo cual se agrega a la reacción seroalbúmina bovina (BSA) y phi29 a concentraciones finales de 0,1 mg/mL y 0,4 U/ μL , respectivamente, y se incuba durante 2 horas a 30°C seguido de 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. En el paso final se purifica el ADN utilizando esferas magnéticas con el kit *Agencourt AMPure XP* (Beckman-Coulter, Estados Unidos) siguiendo especificaciones del fabricante.

3.2.3. CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos (ARN, ADNc y librerías) se cuantificaron por fluorometría utilizando el equipo Qubit™ y el kit *Qubit™ DNA-HS Assay* (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) disponible en la Sección y siguiendo especificaciones del fabricante. La purificación de ADNc ds y las librerías para secuenciación fue realizada utilizando esferas magnéticas con el kit *Agencourt AMPure XP* (Beckman-Coulter, Estados Unidos) siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.2.4. CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS

Las librerías se construyeron con el kit *Nextera DNA Flex Library Preparation* (Illumina, Estados Unidos) siguiendo las especificaciones del fabricante y utilizando 9 ng de ADN doble hebra. La generación de librerías a partir de ADN doble hebra consiste en un proceso de un solo paso denominado tagmentación que combina la fragmentación del mismo seguido de la adición de adaptadores en sus extremos. Los adaptadores oligonucleotídicos que se unen a los extremos 5' y 3' de cada fragmento de ADN generado son necesarios para amplificar los fragmentos de ADN generados y para el agregado de los *index*. Éstos últimos son secuencias cortas de nucleótidos que ofician de identificadores únicos para cada muestra, permitiendo posteriormente distinguir los *reads* correspondientes a cada muestra en los datos generados tras la secuenciación.

El análisis de calidad y tamaño de los fragmentos generados se realizó en el equipo de electroforesis capilar *Fragment Analyzer 5200* (Agilent Technologies, Estados Unidos) con el kit *High Sensitivity DNA NGS Analysis* (Agilent Technologies, Estados Unidos), utilizando 2 μL de librería de cada muestra y siguiendo especificaciones del fabricante.

3.2.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS

La secuenciación se llevó a cabo en el equipo MiSeq (Illumina, Estados Unidos) disponible en la Plataforma Genómica de la Facultad de Ciencias. Se preparó el pool de librerías normalizando la concentración de cada una a 4 nM. El kit de secuenciación

utilizado fue el *Mid Output Reagent Cartridge* (300 ciclos, generando *reads pair-end* de 150 pb) según el protocolo estándar de Illumina.

Los análisis de los archivos fastq obtenidos se analizaron informáticamente utilizando el software *Geneious* (<https://www.geneious.com>). Se procedió a la remoción de *reads* de baja calidad (*trimming*) utilizando el plugin *BBDuk*, determinando una calidad umbral de Q30 (probabilidad 1 en 1000 de que la base haya sido adjudicada erróneamente). Utilizando el mapeador *Minimap2* de *Geneious* se realizó un mapeo por referencia de los *reads* de cada muestra respecto al genoma de referencia para BCoV (accession number: NC_003045). Las secuencias consenso de los genomas se obtuvieron por mayoría y se realizó la anotación de los diferentes marcos abiertos de lectura y regiones reguladoras, utilizando como referencia la anotación del genoma de HCoV OC43 (accession number: KF530068) el cual cuenta con la anotación post clivaje de las poliproteínas *pp1a* y *pp1ab*.

Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa de Alineación Múltiple mediante Transformada Rápida de Fourier (*MAFFT*) utilizando secuencias de referencia a nivel mundial. Las relaciones filogenéticas fueron analizadas con *IQTree* usando criterios de selección Bayesianos, donde se determinó el modelo de sustitución a utilizar para luego construir árboles filogenéticos de máxima verosimilitud filogenética con el software *PhyML - FastTree*, el cual resultó ser el de Jukes y Cantor.

La recombinación, el cual es un mecanismo muy frecuente en los coronavirus, se detectó mediante incongruencias de éstos árboles filogenéticos basados en las diferentes regiones genómicas, que luego se confirmó con el software RDP4 (*Recombination Detection Program*). RDP4 es un software que integra seis algoritmos (RDP, Bootscann, MaxChi, Chimaera, GeneConv y Sisscan) mediante los que puede detectar las secuencias recombinantes, sus hipotéticas secuencias parentales y la posición nucleotídica de recombinación. Estos algoritmos mencionados están basados en dos metodologías: RDP y *Bootscann* se basan en métodos filogenéticos que comparan filogenias de distintas regiones de la secuencia y detectan incongruencias en la topología; y por otro lado MaxChi, Chimaera, GeneConv y Sis-scan se basan en métodos de sustitución nucleotídica que define un agrupamiento de sustituciones en las secuencias que se ajuste a una distribución estadística esperada. Para el análisis se utilizó un tamaño de ventana de 100 pb y una significancia estadística de $p \leq 0,001$ (Martin et al., 2015).

3.3. APLICACIÓN DEL PROTOCOLO ESTANDARIZADO

Una vez que se estandarizó los pasos y condiciones para la secuenciación genómica de BCoV con la muestra 6084, se procedió a su aplicación para las muestras 5097, 5222, 5371, 6018, 6039 y 6042.

Todos los protocolos de laboratorio, así como el análisis bioinformático de las secuencias generadas, es igual al que se describió anteriormente.

4. Resultados

4.1. PUESTA A PUNTO DE PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN

4.1.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA 6084

Se confirmó la presencia de ARN de BCoV por qPCR en la muestra 6084 filtrada (6084 F) y sin filtrar (6084 SF), con valores de ciclo umbral (Ct) de 17,5 y 20,4, respectivamente, siendo de 14,6 el valor de Ct del control positivo utilizado.

Mediante fluorimetría, se determinó la concentración de ADN doble hebra en cada procesamiento para la muestra en estudio: 6084 F: 0,206 ng/μL y SF: 0,524 ng/μL. Conociendo esta concentración de ADN, se construyeron las librerías que posteriormente se analizaron por electroforesis capilar. Los perfiles obtenidos mediante electroforesis capilar reflejaron un tamaño y una distribución de fragmentos compatibles con los criterios de calidad establecidos para las librerías. El tamaño de fragmento más abundante para 6084 SF fue de 379 pb, mientras que para 6084 F fue de 451 pb (figura 12).

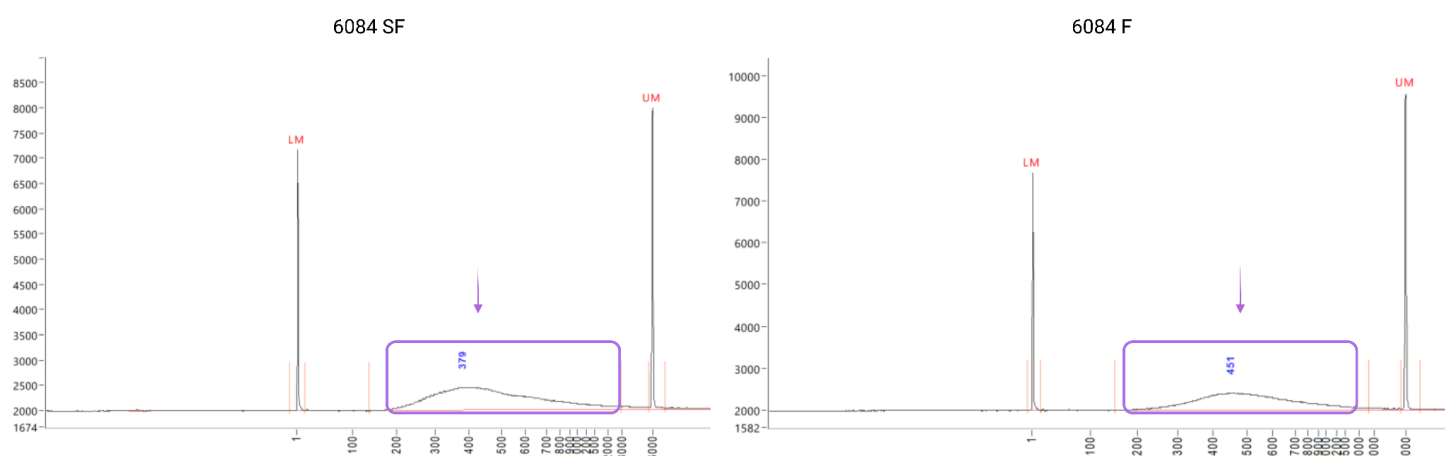


Figura 12. Electroferograma de las librerías realizado en un equipo de electroforesis capilar *Fragment Analyzer 5200* de Agilent. En eje vertical: Unidades relativas de fluorescencia (RFU), en eje horizontal: pares de bases (pb). LM y UM = marcadores de tamaño, 1 pb y 6000 pb, respectivamente. Tamaño de fragmento más abundante en las muestras: 451 pb en 6084 F y 379 pb en 6084 SF.

4.1.2. SECUENCIACIÓN Y ENSAMBLAJE DE GENOMA DE BCoV

Los archivos fastq obtenidos a partir de la secuenciación mediante la plataforma MiSeq fueron sometidos a un proceso uniforme de filtrado de calidad (*trimming*) de los *reads*. Posteriormente, se procedió al ensamblaje del genoma de BCoV mediante alineamiento con un genoma de referencia. En la tabla 4 se detallan la cantidad de *reads*

originales, los que permanecieron tras el filtrado de calidad y aquellos que fueron finalmente utilizados por el módulo de mapeo del software *Geneious* para la reconstrucción del genoma de BCoV.

Tabla 4. Cantidad de *reads* obtenidos tras la secuenciación Illumina, después del filtrado de calidad y que se ensamblan al genoma de referencia de BCoV (accession number: NC_003045) en la muestra filtrada (F) y sin filtrar (SF).

Muestra	Cantidad de <i>reads</i> totales	Cantidad de <i>reads</i> post-trimming	Cantidad de <i>reads</i> que ensamblan genoma de BCoV
6084 F	5.378.392	4.995.258	3.583.943
6084 SF	3.216.414	3.150.971	57.083

La ausencia de un paso de filtrado previo a la extracción de ARN resulta en una notable disminución en la proporción de *reads* generados durante la secuenciación que corresponden al genoma de BCoV. La inclusión del paso de filtrado permite obtener una mayor cobertura y profundidad de lectura, lo que mejora sustancialmente la calidad del ensamblaje genómico, tal como se muestra en la figura 13, donde se ilustra que si bien en ambos casos se logra una cobertura del 100% del genoma (azul), en el caso de la muestra filtrada se obtiene una profundidad de lectura máxima ampliamente mayor, siendo 34536 en la muestra filtrada y 565 en la muestra sin filtrar.

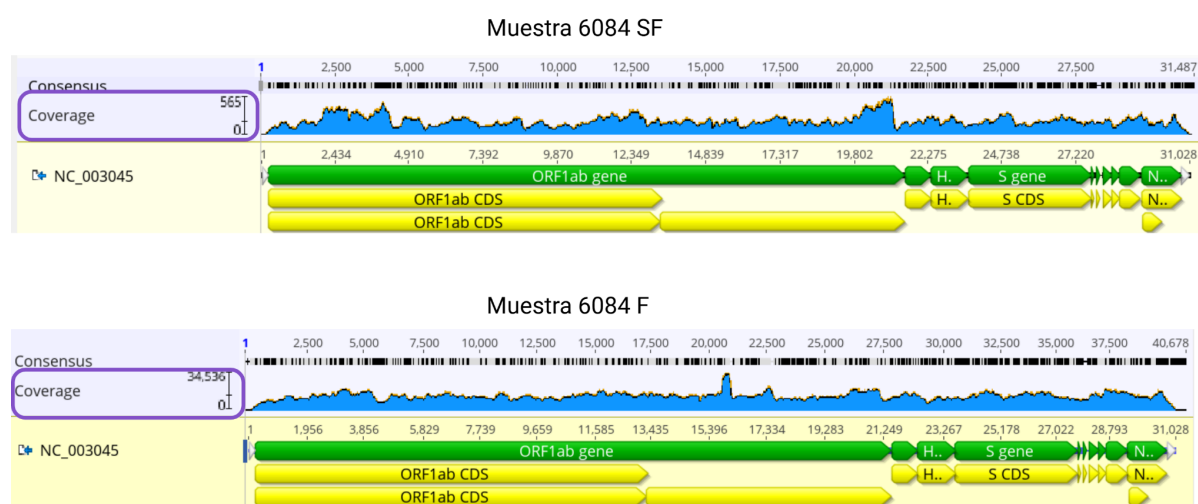


Figura 13. Cobertura del ensamblaje y profundidad de lectura de secuencia en la muestra 6084 sin filtrar y filtrada. Superior: muestra 6084 sin filtrar. Inferior: muestra 6084 filtrada.

En base a estos resultados, se decidió establecer el paso inicial de filtración con filtro de nitrocelulosa de 0,45 μ m como parte del protocolo para la secuenciación genómica de BCoV del resto de las muestras con las que se trabajaron en esta tesina.

4.2. EJECUCIÓN DE PROTOCOLO ESTANDARIZADO

El protocolo estandarizado en la sección 4.1 se aplicó en las muestras 5097, 5222, 5371, 6018, 6039 y 6042. En la tabla 5 se detallan los valores de Ct obtenidos en la detección del genoma de BCoV mediante qPCR para dichas muestras.

Tabla 5. Valores de Ct obtenidos por qPCR para las muestras en estudio.

Muestra	Valor de Ct en qPCR
5097	26
5222	28,2
5371	31
6018	32
6039	37,2
6042	22,4
Control positivo	14,6
Control negativo	No detectable

En la tabla 6 se presentan los valores de concentración del ADN doble hebra que fueron muestra de partida para la realización de las librerías.

Tabla 6. Cuantificación de ADNc doble hebra en cada muestra mediante fluorometría con equipo Qubit™.

Muestra	Concentración de ADNc doble hebra (ng/μL)
5097	0,320
5222	0,274
5371	0,354
6018	0,170
6039	0,200
6042	1,690

El análisis de electroforesis capilar realizado para evaluar la calidad de las librerías evidenció un tamaño y una distribución de fragmentos acorde a lo esperado (figura 14).

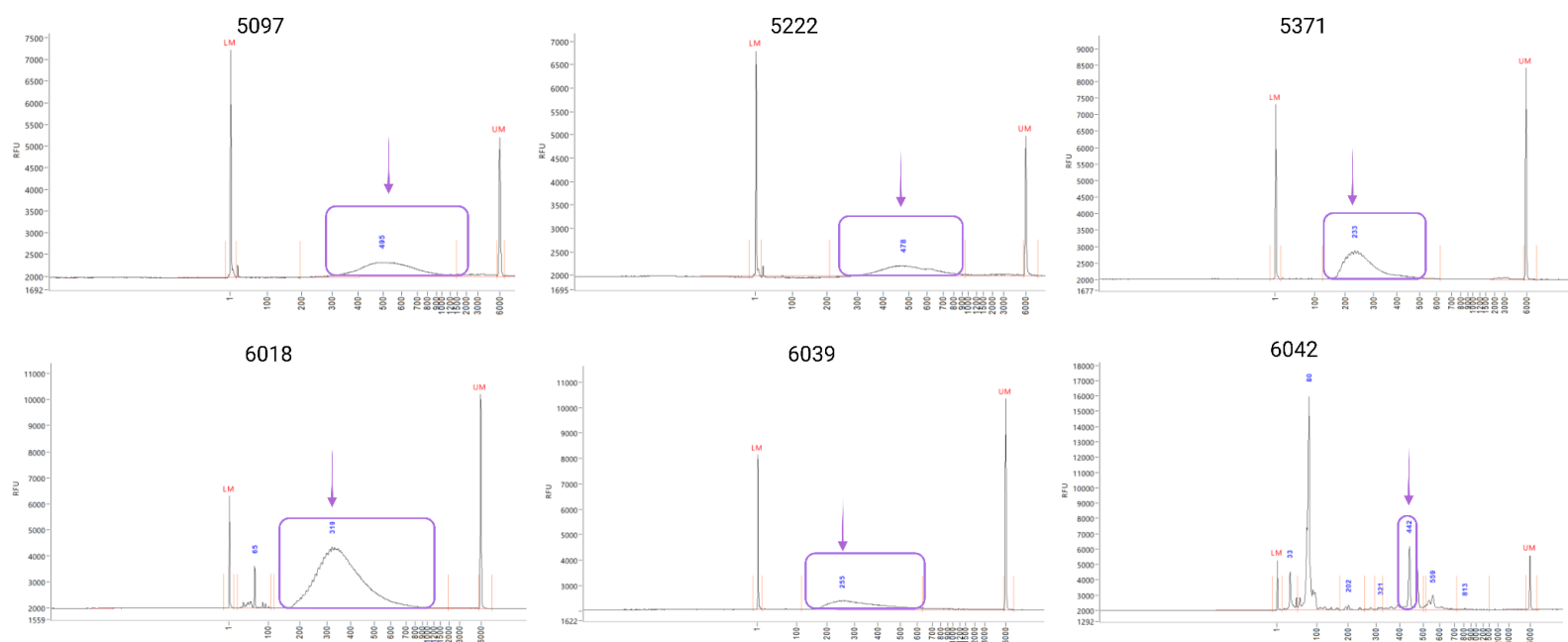


Figura 14. Electroferograma de las librerías realizado en un equipo de electroforesis capilar *Fragment Analyzer 5200* de Agilent. En eje vertical: Unidades relativas de fluorescencia (RFU), en eje horizontal: pares de bases (pb). LM y UM = marcadores de tamaño, 1 pb y 6000 pb, respectivamente. Tamaño de fragmento más abundante en las muestras: 495 pb en 5097, 478 pb en 5222, 233 pb en 5371, 319 pb en 6018, 255 pb en 6039, 442 pb en 6042.

4.3. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

4.3.1 ENSAMBLAJE DE GENOMA DE BCoV

Utilizando como referencia el genoma completo de BCoV (número de acceso: NC_003045) y empleando el mapeador Minimap2 del software Geneious, se llevó a cabo el mapeo de los *reads* de alta calidad obtenidos tras el proceso de secuenciación, contenidos en los archivos *fastq*. Como resultado, se logró el ensamblaje genómico completo de BCoV en las muestras 5097, 5222, 5371, 6018, 6042 y 6084, obteniéndose para cada una de ellas su correspondiente secuencia consenso. En el caso de la muestra 6039, que presentó un valor de Ct de 37,2, el ensamblaje resultó incompleto debido a la escasa cantidad de *reads* generados que lograron alinearse con la secuencia de referencia (ver figura S1 de la Sección Material Suplementario).

4.3.2 VARIANTES DE SECUENCIAS URUGUAYAS

Se identificaron las variantes presentes en las secuencias uruguayas en comparación con la secuencia de referencia del *GenBank* y la secuencia prototipo vacunal Mebus.

Los cambios no sinónimos, es decir, aquellos que generan sustituciones de aminoácidos en las distintas regiones codificantes del genoma, se detallan en la Tabla 7.

En cuanto a la comparación con la secuencia de referencia del *GenBank*, al considerar la relación entre el tamaño de cada región y la cantidad de sustituciones observadas, se destaca que las regiones que codifican para *nsp1*, *nsp3*, la glicoproteína S y la proteína de nucleocápside N son las que acumulan mayor número de cambios. En particular, las regiones *nsp1*, S y N presentan un mayor número de sustituciones compartidas entre las secuencias colectadas en 2024, mientras que en la región *nsp3*, las secuencias correspondientes al período 2017–2019 muestran la mayor cantidad de sustituciones comunes.

El mismo análisis realizado respecto a la secuencia vacunal Mebus arroja que las regiones que más cambios acumulan son las codificantes para *nsp3*, la glicoproteína S y HE. No obstante, al tomar en cuenta sólo las sustituciones compartidas por las secuencias uruguayas del período 2017-2019, las regiones que más cambios acumulan son *nsp2* y S. Y si se considera las sustituciones por las secuencias uruguayas del 2024, lo son *nsp1*, HE y S.

Tabla 7. Sustituciones nucleotídicas que generan sustituciones aminoacídicas en las secuencias uruguayas respecto a la secuencia referencia del GenBank (RefSeq, *accession number*: NC_003045) y respecto a la secuencia prototipo vacunal Mebus (*accession number*: BCU00735).

Región codificante	Largo de región (pb)	N° de sustituciones totales		N° de sustituciones presentes en todas las secuencias uruguayas		N° de sustituciones presentes sólo en todas las secuencias uruguayas de 2017-2019		N° de sustituciones presentes sólo en todas las secuencias uruguayas de 2024	
		Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus	Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus	Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus	Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus
<i>pp1a/nsp1</i>	737	16	8	-	-	2	1	12	6
<i>pp1a/nsp2</i>	1814	18	13	-	4	6	3	2	1
<i>pp1a/nsp3</i>	5696	96	49	18	11	12	6	-	-
<i>pp1a/nsp4</i>	1487	4	7	-	5	-	1	4	1
<i>pp1a/nsp5</i>	908	8	9	2	4	4	3	-	1
<i>pp1a/nsp6</i>	860	2	2	-	1	-	-	2	1
<i>pp1a/nsp7</i>	266	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>pp1a/nsp8</i>	590	8	5	-	3	-	-	-	-
<i>pp1a/nsp9</i>	329	-	1	-	-			-	-
<i>pp1a-pp1ab/</i>	2782	2	5	-	3	-	-	1	1

<i>nsp11-nsp12</i>									
<i>pp1ab/nsp13</i>	1808	2	5	-	3	1	1	1	1
<i>pp1ab/nsp14</i>	1562	1	4	1	4	-	-	-	-
<i>pp1ab/nsp15</i>	1122	5	6	1	2	1	1	3	3
<i>pp1ab/nsp16</i>	905	1	2	-	1	1	1	-	-
HE	1274	10	13	-	3	2	-	6	8
S	4091	43	67	11	22	8	11	14	18
E	272	1	2	-	1	1	1	-	-
M	692	6	6	1	1	2	3	2	1
N	1346	22	10	6	3	2	-	8	4

Adicionalmente, se analizaron las sustituciones aminoacídicas que presentaron las secuencias uruguayas respecto a la secuencia referencia y la secuencia vacunal Mebus en las regiones más variables de S. Dichas regiones son: la porción amino-terminal S1, la región que contiene los dominios antigénicos A y B (S1_A-S1_B), y la región hipervariable (HVR) (tabla 8).

Tabla 8. Sustituciones nucleotídicas que generan sustituciones aminoacídicas en las secuencias uruguayas respecto a la secuencia referencia del GenBank (RefSeq, *accession number*: NC_003045) y respecto a la secuencia prototipo vacunal Mebus (*accession number*: BCU00735) en las regiones más variables del gen S.

Región codificante	Largo de región (pb)	N° de sustituciones totales		N° de sustituciones presentes en todas las secuencias uruguayas		N° de sustituciones presentes sólo en todas las secuencias uruguayas de 2017-2019		N° de sustituciones presentes sólo en todas las secuencias uruguayas de 2024	
		Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus	Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus	Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus	Respecto a RefSeq	Respecto a Mebus
S1	2304	29	45	4	15	7	8	4	8
S1 _A -S1 _B	1188	12	17	2	7	4	3	1	2
HVR	408	9	14	1	6	4	3	-	1

Las secuencias uruguayas presentan mayor número de cambios respecto a la secuencia vacunal Mebus que a la secuencia de referencia. A su vez, se destaca que el 75% de las sustituciones respecto a la secuencia de referencia en la región S1_A-S1_B se concentran

en la región HVR, mientras que respecto a la secuencia vacunal Mebus este porcentaje asciende al 82%.

Finalmente, se obtuvo la tabla de porcentaje de identidad de las cepas uruguayas respecto a la secuencia de referencia (tabla 9) y a la secuencia de la cepa vacunal Mebus (tabla 10), para la región genómica de HVR. Se observa que, para esta región, las secuencias uruguayas de 2017-2019 tienen en promedio un porcentaje de identidad con la secuencia de referencia de 96,77%, mientras que respecto a la secuencia vacunal es menor, siendo de 95,13%. En cuanto a las secuencias uruguayas de 2024, el porcentaje de identidad respecto a la secuencia de referencia resultó ser idéntico en todas: 96,852%. Por otro lado, se observa que respecto a la identidad con la secuencia vacunal el porcentaje promedio es menor al que muestran las secuencias uruguayas más antiguas, siendo del 94,404%

Tabla 9. Porcentaje de identidad de las secuencias uruguayas respecto a la secuencia referencia del GenBank (RefSeq, *accession number*: NC_003045) en la región hipervariable del gen S (HVR).

	RefSeq	5097	5222	5371	6018	6042	6084
RefSeq		96.368	96.852	97.094	96.852	96.852	96.852
5097			98.305	98.305	96.126	95.642	96.126
5222				98.063	97.337	96.368	96.852
5371					96.368	95.884	96.368
6018						98.063	99.031
6042							99.031
6084							

Tabla 10. Porcentaje de identidad de las secuencias uruguayas respecto a la secuencia prototipo vacunal Mebus (*accession number*: BCU00735) en la región hipervariable del gen S (HVR).

	Mebus	5097	5222	5371	6018	6042	6084
Mebus		94,981	94,981	95,62	94,647	94,404	94,161
5097			98,297	98,297	96,35	95,62	95,864
5222				98,054	97,567	96,35	96,594
5371					96,594	95,864	96,107
6018						97,81	98,54
6042							98,783
6084							

4.3.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

4.3.3.1 Caracterización genética de secuencias uruguayas

Como primer paso, se llevó a cabo la clasificación genética de las secuencias uruguayas analizadas en este estudio mediante un análisis filogenético basado en un fragmento de 443 nucleótidos de S1 correspondientes a la región HVR, entre las posiciones 24984-25426 de la cepa de referencia Mebus. La elección de este fragmento se fundamenta en la disponibilidad de secuencias correspondientes a aislamientos sudamericanos, particularmente de Brasil y Argentina, lo que permite incorporar información regional al análisis. Para ello, se utilizó el mismo conjunto de secuencias empleado por Castells et al. (2019) (figura 15).

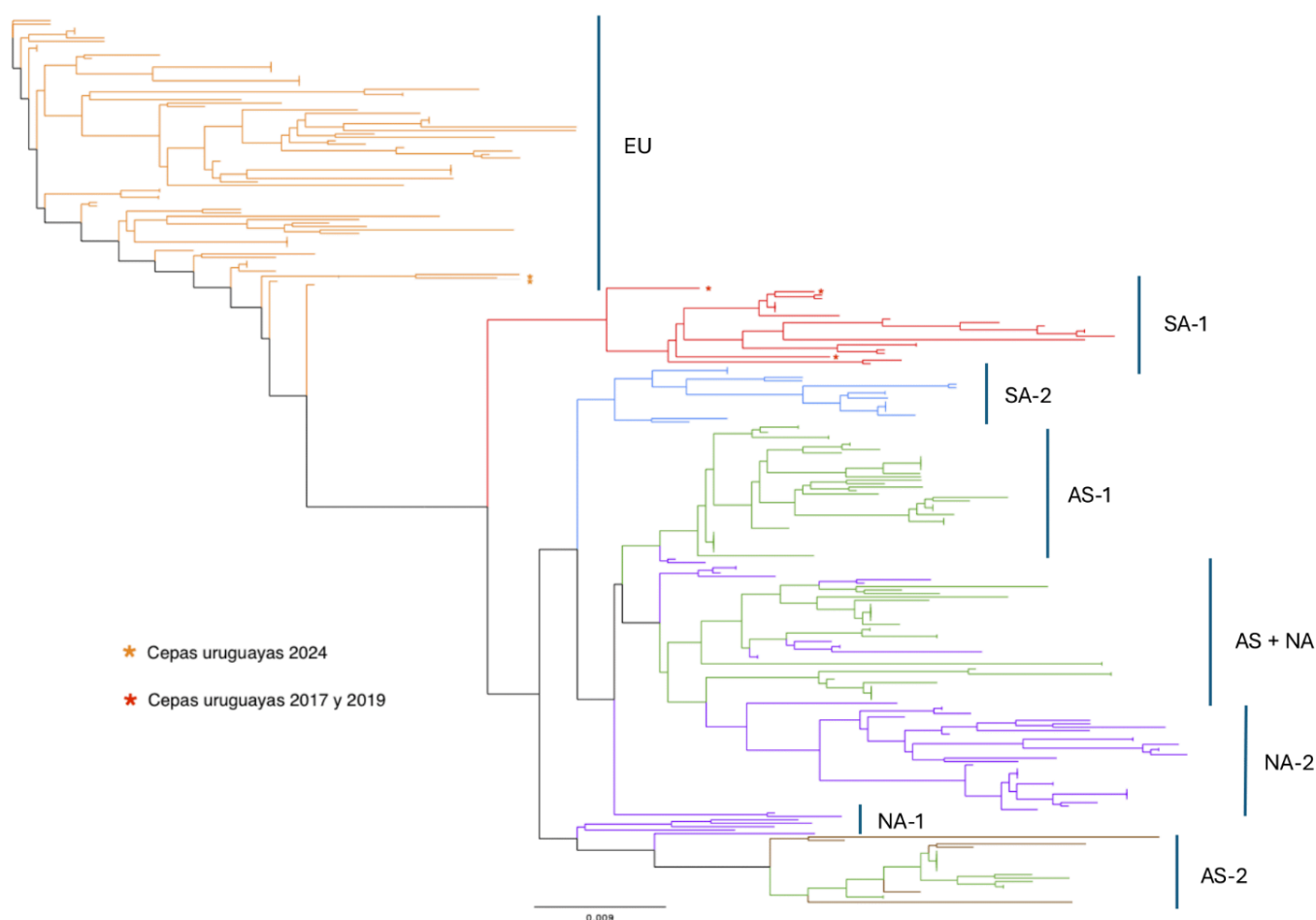


Figura 15. Análisis filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias parciales de S1 de BCoV que comprenden HVR (443 nucleótidos correspondientes a las posiciones 24984-25426 de la cepa de referencia) disponibles en la base de datos NCBI. Cepas uruguayas se identifican con estrellas anaranjadas (2024) y rojas (2017-2019). Los linajes se denominan según el continente donde se aisló la muestra: AS= Asia; EU=Europa; NA= Norteamérica; SA=Sudamérica. Metodología descrita y aplicada en Castells et al., 2019. El árbol sin colapsar se muestra en la figura S2 de la sección Material Suplementario.

En el análisis filogenético realizado, se observó que las secuencias uruguayas 5097, 5222 y 5371, correspondientes al período 2017–2019, se agrupan dentro del linaje sudamericano previamente identificado por Castells et al. (2019), el cual incluye secuencias argentinas y uruguayas. Por el contrario, las secuencias uruguayas 6018, 6042 y 6084, obtenidas en 2024, no se agrupan con ninguno de los dos linajes sudamericanos previamente descritos, sino que conforman un tercer linaje sudamericano de BCoV, no reportado hasta el momento.

4.3.3.2 Análisis de genomas completos

Para llevar a cabo este análisis, se construyó una base de datos que incluye los 200 genomas completos de BCoV disponibles en la plataforma NCBI. Además de las secuencias nucleotídicas, la base de datos recopila información asociada como la fecha y ubicación geográfica de recolección, la especie hospedadora y el tipo de muestra biológica.

En una primera etapa, se excluyeron de esta base los genomas previamente identificados como recombinantes. En particular, se eliminaron del alineamiento las 12 secuencias recombinantes reportadas por Bahoussi et al. (2023). Adicionalmente, se realizaron análisis filogenéticos independientes para cada uno de los principales marcos de lectura abiertos (ORFs), incluyendo *pp1a*, *pp1ab*, HE, S, E, M y N, con el fin de identificar incongruencias filogenéticas indicativas de eventos de recombinación. Las secuencias que presentaron discrepancias filogenéticas entre distintos ORFs fueron posteriormente analizadas con el software RDP4, lo que permitió identificar 17 secuencias adicionales con evidencia de recombinación (tabla 11).

Tabla 11. Secuencias de genoma completo de BCoV recombinantes detectadas mediante RDP4.

Accession number	País	Posición nucleotídica de recombinación
ON146444	Estados Unidos	27913
OP004056	Estados Unidos	25179
OP296992	Taiwan	20756
MG518518	Corea del Sur	22127
ON792944	Irlanda	27307
ON792951	Irlanda	28469
ON792956	Irlanda	27307
OR077306	China	25077
OR077307	China	25077
OR077308	China	25077

OR077309	China	25077
OR077310	China	25077
OR077311	China	25077
PP101630	China	8965
OP866728	China	7661 y 21655
OP866729	China	22413
PQ313104	China	8965

Se llevaron a cabo análisis filogenéticos basados en diferentes marcos de lectura abiertos (ORFs) del genoma de BCoV, utilizando los seis genomas completos obtenidos en este estudio junto con el conjunto de 171 genomas no recombinantes (figuras 16-20). Las filogenias completas, sin grupos de secuencias colapsados, se presentan en Material Suplementario.

Las filogenias basadas en los ORFs *pp1a* y *pp1ab* presentan la misma topología. Todas las cepas uruguayas forman un grupo monofilético con cepas de Europa Occidental; específicamente con cepas de Francia colectadas en 2014, de Irlanda colectadas en 2019 y con una cepa de Noruega del año 2012. Dentro de este grupo las cepas se dividen en tres subclados que agrupan las siguientes cepas: cepas uruguayas del 2017-2019, cepas uruguayas del 2024 y cepas europeas (figuras 16 y 17).

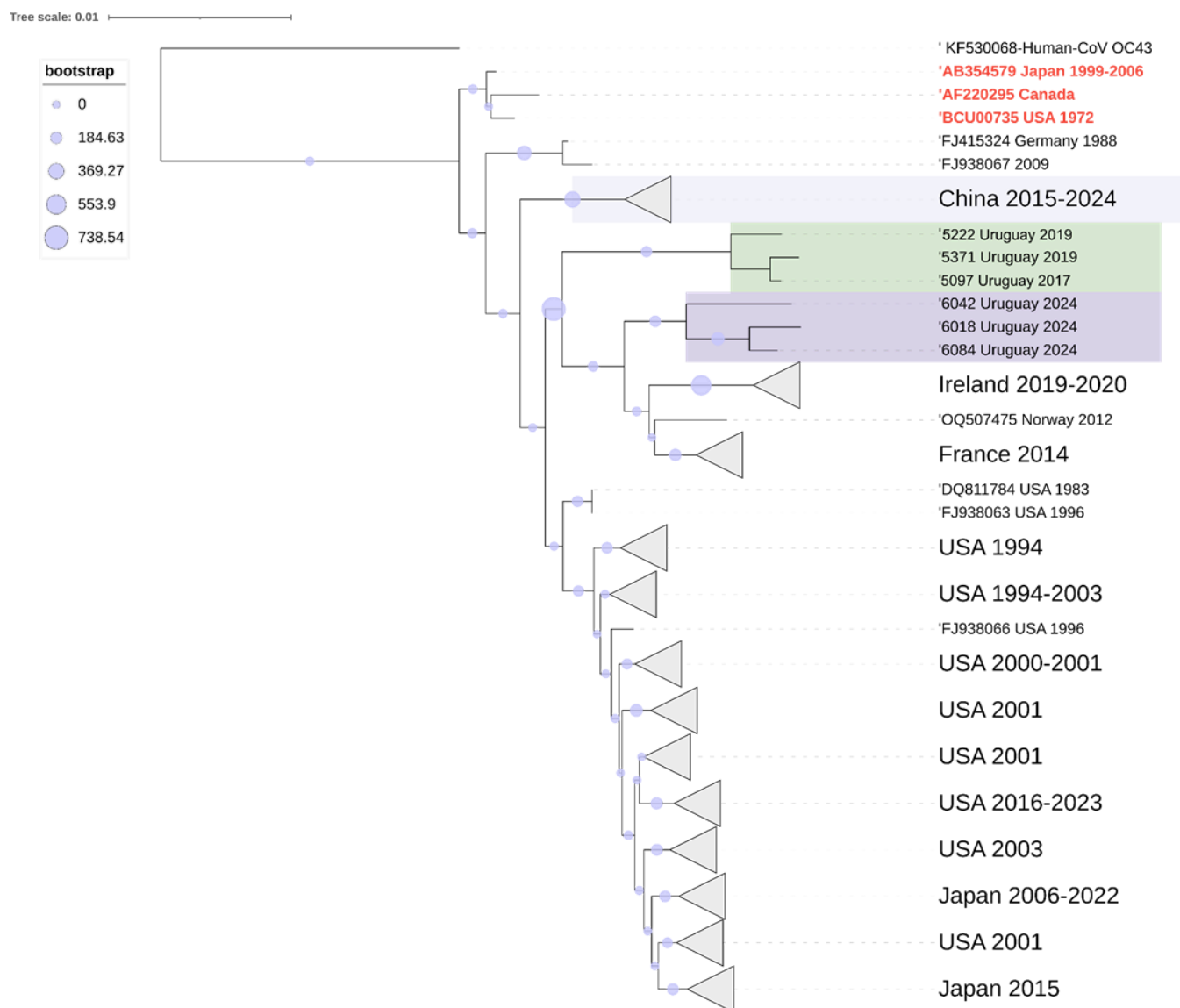


Figura 16. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen *pp1a* de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2017-2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. El árbol sin colapsar se muestra en la figura S3 de la sección Material Suplementario. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

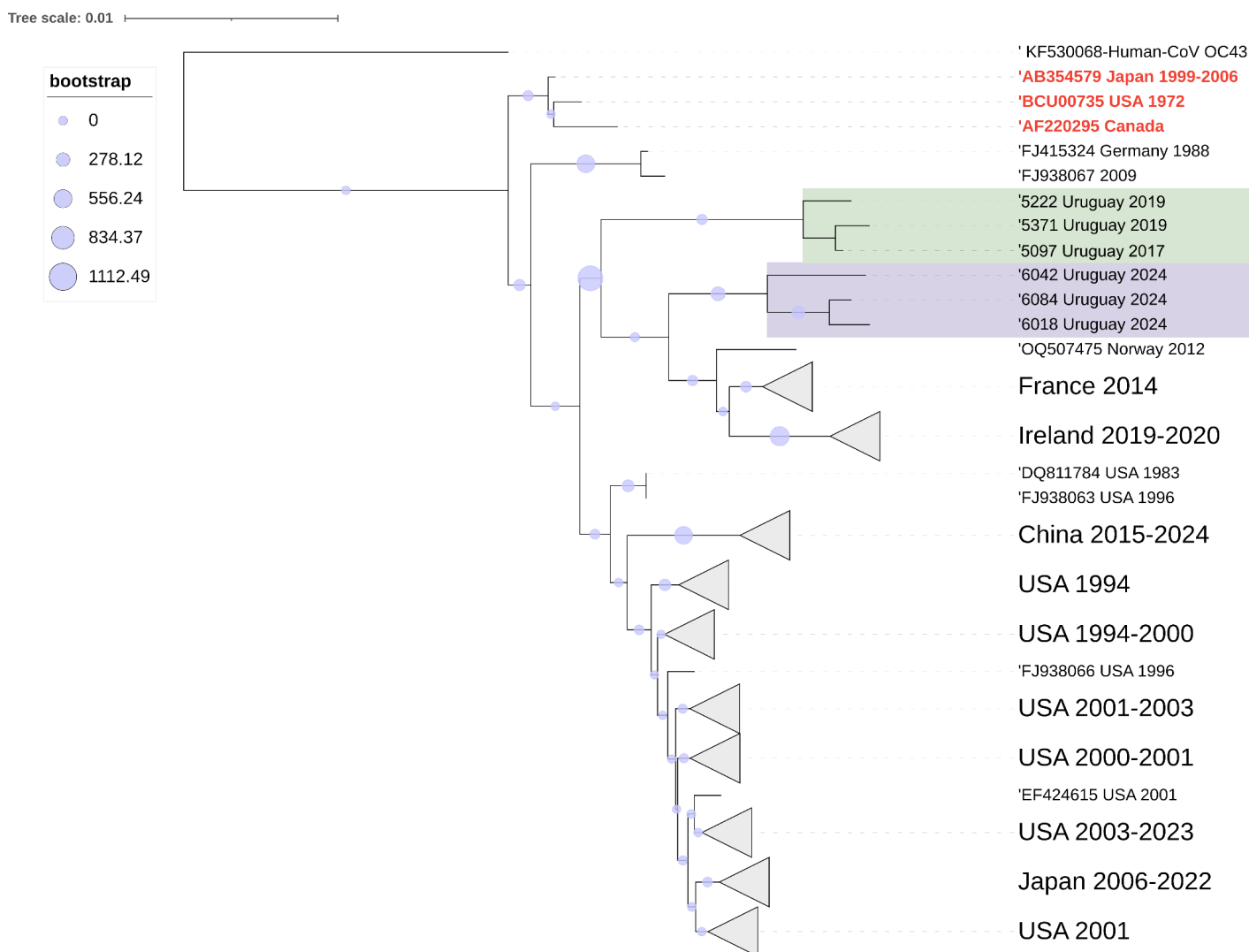


Figura 17. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen *pp1ab* de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2017-2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. El árbol sin colapsar se muestra en la figura S4 de la sección Material Suplementario. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

En la filogenia basada en el ORF HE, las cepas uruguayas del 2024 también forman un grupo monofilético con las cepas de Europa Occidental, mientras que las cepas del 2017-2019 se asocian formando un clado único (figura 18).

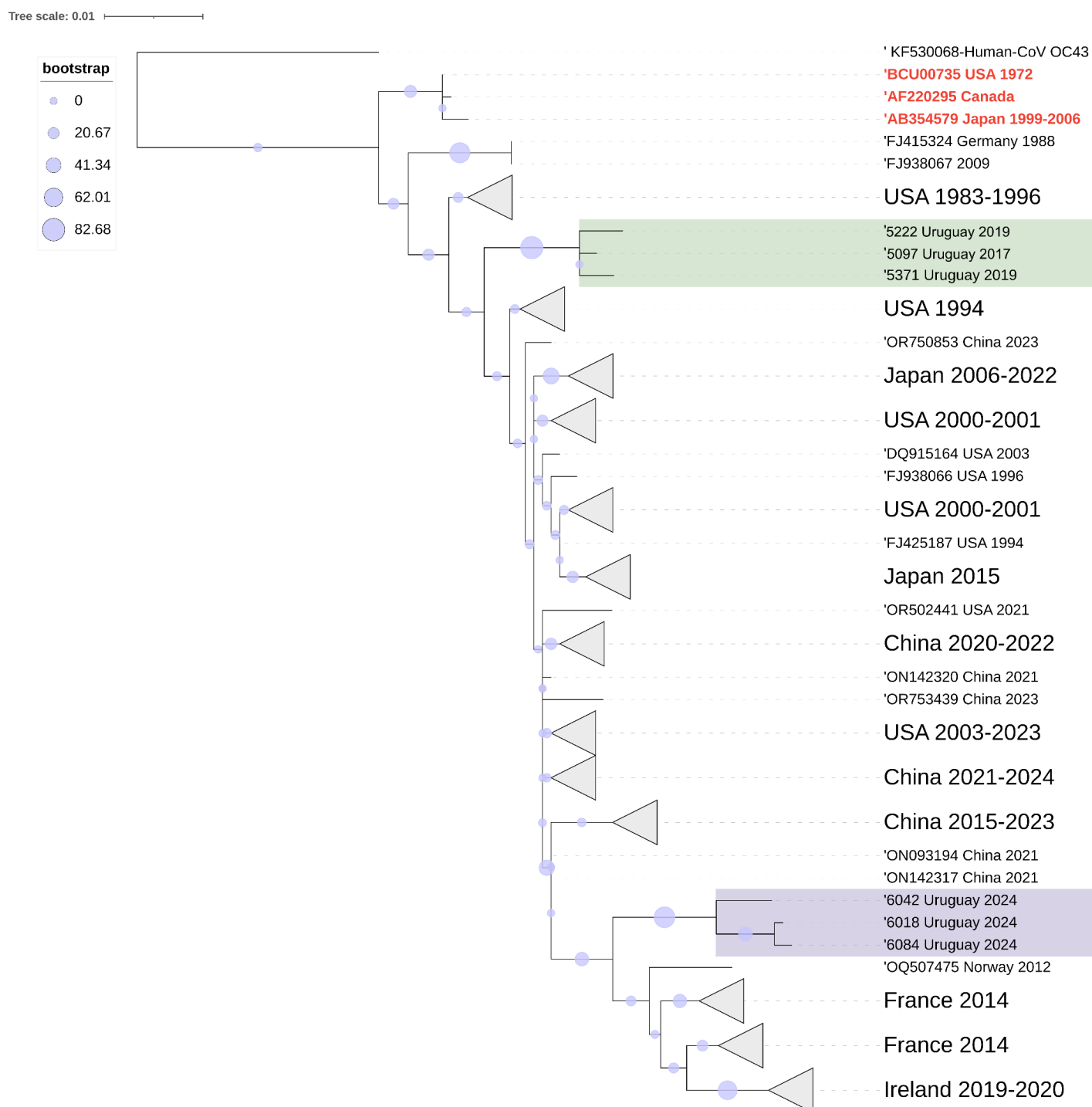


Figura 18. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen HE de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2017-2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. El árbol sin colapsar se muestra en la figura S5 de la sección Material Suplementario. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

En la filogenia basada en el ORF S, las cepas uruguayas nuevamente forman un grupo monofilético con cepas de Europa Occidental, mientras que las cepas uruguayas del 2017-2019 vuelven a formar un clado único. (figura 19).

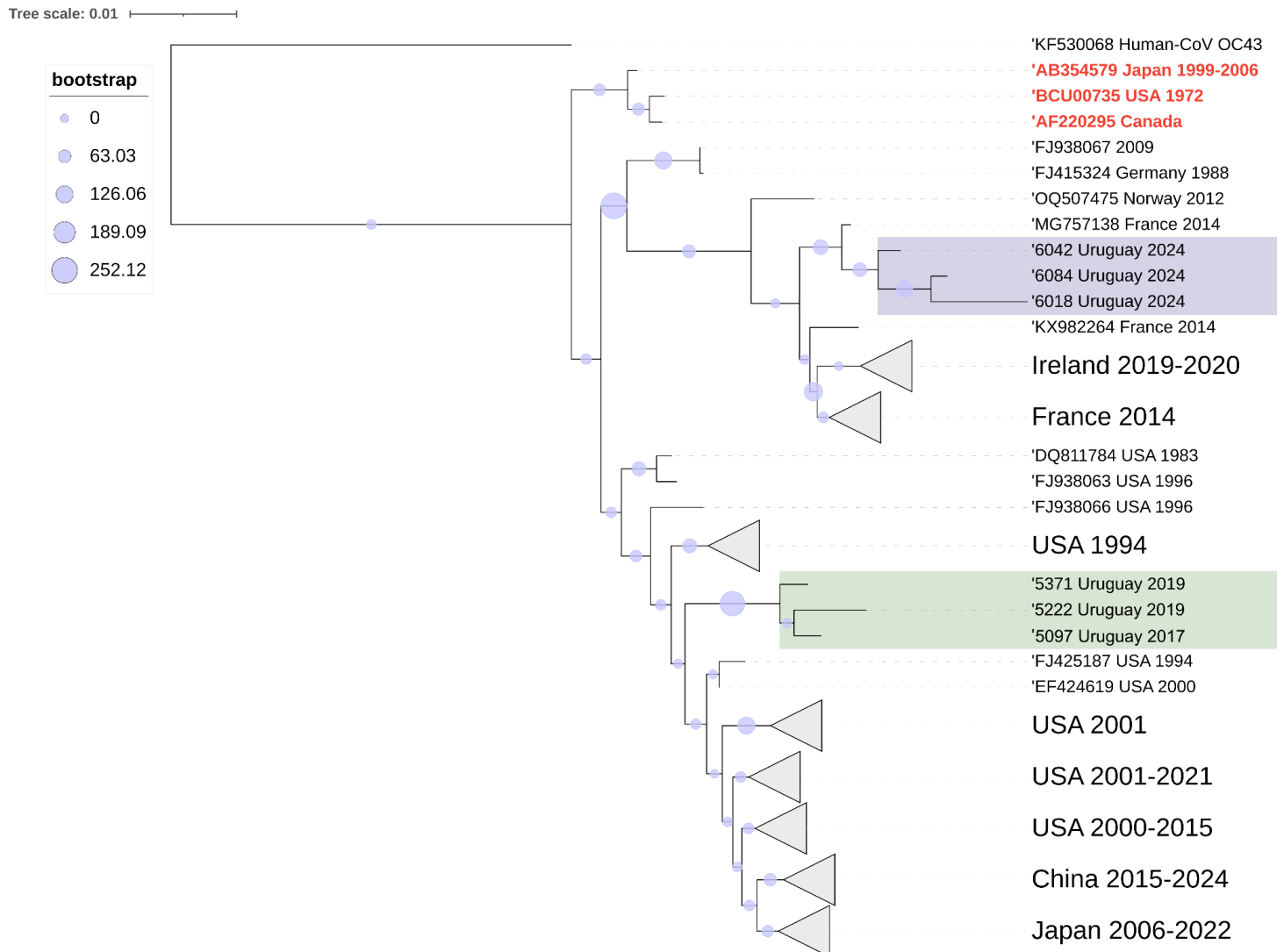


Figura 19. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen S de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2017-2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. El árbol sin colapsar se muestra en la figura S6 de la sección Material Suplementario. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

Los ORFs E, M y N fueron concatenados para realizar una filogenia, debido a que las secuencias nucleotídicas de dichos genes son cortas y poco informativas a nivel individual para realizar análisis filogenéticos. El agrupamiento de las cepas uruguayas en esta filogenia es igual al observado para el ORF S (figura 20).

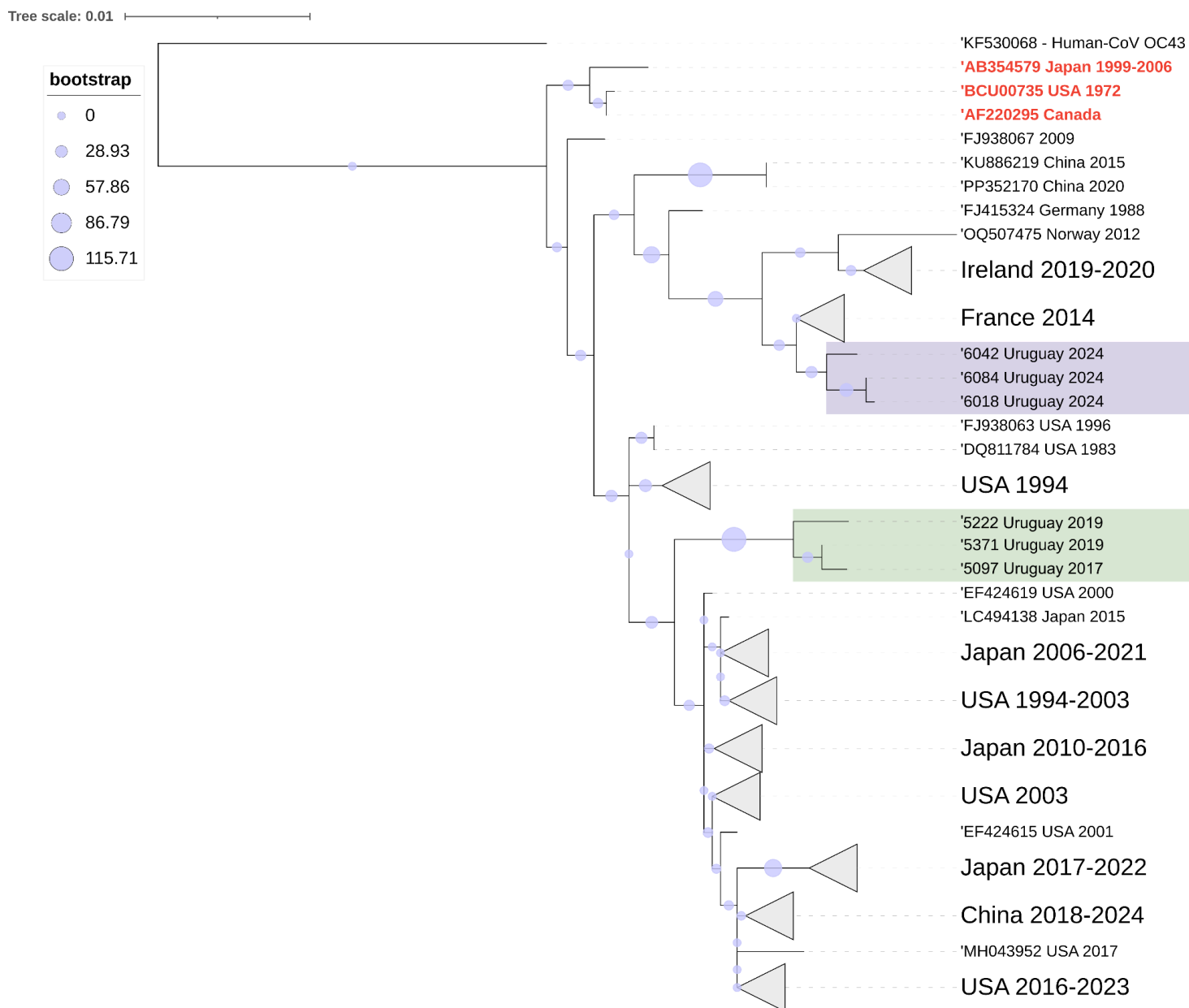


Figura 20. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región que abarca los genes E,M y N de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2017-2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. El árbol sin colapsar se muestra en la figura S7 de la sección Material Suplementario. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

En la tabla 12 se resumen los agrupamientos filogenéticos observados para las cepas uruguayas, para cada ORF del genoma.

Tabla 12. Agrupamiento de las cepas uruguayas en cada ORF en el análisis filogenético gen a gen.

	ORF1a (<i>pp1a</i>)	ORF1ab (<i>pp1ab</i>)	ORF HE	ORF S	ORFs concatenados E-M-N
Cepas uruguayas 2017-2019	Cepas de Europa Occidental	Cepas de Europa Occidental	Clado único	Clado único	Clado único
Cepas uruguayas 2024	Cepas de Europa Occidental	Cepas de Europa Occidental	Cepas de Europa Occidental	Cepas de Europa Occidental	Cepas de Europa Occidental

Tal como se muestra en la Tabla 12, las secuencias uruguayas correspondientes al período 2017–2019 presentan características compatibles con un genoma quimérico. En particular, la región que abarca los ORFs *pp1a* y *pp1ab* muestra alta similitud con cepas de Europa Occidental, mientras que el resto del genoma no comparte este origen. Para evaluar si estas secuencias son producto de un evento de recombinación, se utilizó el software RDP4. Los resultados confirmaron que uno de los genomas parentales corresponde a cepas de Europa Occidental en las regiones *pp1a* y *pp1ab*, mientras que el segundo parental no pudo ser identificado. Esta observación es consistente con el hecho de que dichas secuencias uruguayas forman un clado exclusivo en los análisis filogenéticos de las regiones HE, S y EMN.

5. Discusión

5.1 ANÁLISIS GENÓMICOS EN CORONAVIRUS (CoVs)

5.1.1 RELEVANCIA DE ANALIZAR GENOMAS COMPLETOS

La subfamilia *Orthocoronavirinae*, que incluye a los coronavirus (CoVs), comprende una amplia diversidad de especies capaces de infectar a numerosos hospedadores animales, principalmente aves y mamíferos, ocasionando enfermedades tanto respiratorias como entéricas. El interés científico por entender la diversidad, evolución y dinámica de los CoVs se intensificó de manera significativa a partir de la epidemia de SARS-CoV en 2003, cuando únicamente se disponía de diez genomas completos de coronavirus secuenciados (Woo et al., 2009). Este interés se potenció exponencialmente tras la emergencia sanitaria global provocada por el SARS-CoV-2 en 2019 (Li et al., 2020), lo que impulsó un esfuerzo sin precedentes en la comunidad científica para desarrollar e implementar nuevas herramientas diagnósticas y estrategias de vigilancia molecular para estos virus (Amer, 2018; Colina et al., 2021).

La notable diversidad genética de los CoVs se explica fundamentalmente por tres factores: el considerable tamaño de su genoma de ARN, la tasa de mutación de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Amer, 2018; Masters, 2006; Vlasova & Saif, 2021), y la alta frecuencia de recombinación homóloga, producto del mecanismo de cambio de molde (template-switching) que el virus emplea durante la replicación de su genoma (Wells et al., 2023; Lai, 1990; Lai & Cavanagh, 1997). Estos procesos no solo amplían la diversidad genética de los CoVs, sino que también facilitan la aparición de variantes con mayor capacidad de adaptación a nuevos huéspedes y nichos ecológicos, lo que conlleva frecuentes eventos de transmisión zoonótica con significativas repercusiones para la salud humana y animal. En este contexto, tanto animales silvestres como domésticos actúan como reservorios naturales y fuentes de recombinación y diseminación viral (Woo et al., 2009; Colina et al., 2021).

Los genomas recombinantes de CoVs son moléculas de ARN quiméricas que se originan cuando la RdRp, durante la transcripción, realiza una pausa y cambia de plantilla, desplazando la cadena de ARN naciente hacia un nuevo molde perteneciente a otra variante del virus que coexiste en la misma célula. Como resultado, el genoma recombinante está compuesto por fragmentos genómicos idénticos a cada uno de sus genomas parentales. La detección de estos eventos es posible gracias a herramientas bioinformáticas como el software RDP4, que permite identificar los genomas parentales y localizar los puntos de recombinación mediante el análisis de secuencias completas (Martin et al., 2015).

En este sentido, la obtención y análisis de genomas completos de CoVs es fundamental para la vigilancia genómica y la caracterización detallada de variantes recombinantes,

cuyo surgimiento es altamente frecuente en esta familia viral. La secuenciación completa posibilita la identificación precisa de recombinaciones genómicas, lo cual es clave para comprender la evolución viral, rastrear la aparición de variantes con potencial patogénico o zoonótico y diseñar estrategias efectivas de control y prevención.

El monitoreo continuo de genomas completos facilita la detección temprana de mutaciones emergentes que podrían afectar la eficacia de intervenciones clínicas y sanitarias, contribuyendo así a una respuesta más rápida y eficaz frente a brotes o pandemias.

Ejemplos destacados de recombinación detectados gracias a la secuenciación completa incluyen: la emergencia de un coronavirus felino producto de recombinación entre CoV felino y una variante de CoV canino (Herrewegh et al., 1998); el origen del coronavirus del pavo derivado de recombinación entre una variante patogénica del IBV y un coronavirus de una especie de ave aún no identificada (Jackwood et al., 2010); y la aparición de una nueva variante epidémica del coronavirus causante de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en Estados Unidos, originada por recombinación entre cepas circulantes en China (Tian et al., 2014). Estos ejemplos evidencian la importancia crítica de contar con genomas completos para monitorear y comprender la dinámica evolutiva de los CoVs.

La disponibilidad de genomas completos es fundamental no solo para el monitoreo evolutivo y epidemiológico de estos virus, sino también para el desarrollo y mejora de estrategias diagnósticas, vacunas y tratamientos. Por ejemplo, la amplia secuenciación del SARS-CoV-2 ha permitido identificar rápidamente variantes de preocupación, diseñar vacunas específicas y monitorear su eficacia en tiempo real. Este mismo enfoque resulta crucial para otros CoVs, como el BCoV, que a pesar de su importancia en salud animal y potencial zoonótico, aún carece de un volumen suficiente de datos genómicos para avanzar en su caracterización y control efectivo.

5.1.2 GENOMAS COMPLETOS DE BCoV

En cuanto a la disponibilidad de secuencias completas de genomas de coronavirus en bases de datos públicas, hasta la fecha se registran 1.274 genomas completos de *Infectious Bronchitis Virus* (IBV), 942 de *Porcine Epidemic Diarrhea Virus* (PEDV) y 679 de *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) en la base de datos del NCBI. En la plataforma GISAID, especializada en el intercambio de datos genómicos del SARS-CoV-2, se encuentran disponibles más de 20 millones de genomas completos de SARS-CoV-2 humano (20.886.858 genomas, actualizado a la fecha). Sin embargo, en comparación con estos virus, el *Coronavirus Bovino* cuenta con un número considerablemente menor de secuencias genómicas completas, con apenas 200 registros disponibles en el NCBI. Esta limitación repercute directamente en la escasez de análisis filogenéticos detallados y estudios genómicos exhaustivos sobre BCoV, lo que dificulta una comprensión profunda de su diversidad genética y evolución.

A nivel regional, específicamente en Sudamérica, no se cuenta con registros públicos de genomas completos de BCoV, lo que subraya aún más la importancia de los seis genomas completos obtenidos en el presente estudio, que representan los primeros reportes de esta índole para la región. Este vacío en la información también contrasta con otros coronavirus de importancia veterinaria y zoonótica, como el coronavirus porcino delta (PDCoV) o el coronavirus felino (FCoV), para los cuales existen datos genómicos más amplios y en expansión.

5.1.3 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN GENOMAS COMPLETOS DE BCoV

Los coronavirus presentan un genoma de ARN de gran tamaño, que varía entre 27 y 32 kilobases (Masters, 2006). Esta característica plantea un desafío considerable para la obtención de secuencias completas mediante tecnologías de primera generación como la secuenciación por método Sanger, debido a la necesidad de diseñar numerosos pares de cebadores (primers) para amplificar fragmentos que permitan una cobertura adecuada del genoma. En contraposición, las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) se han consolidado como una alternativa más eficiente y práctica para este propósito, ya que no requieren el diseño previo de primers específicos y permiten obtener secuencias de genomas completos con alta cobertura y profundidad de lectura.

No obstante, para que la secuenciación por NGS resulte eficiente en términos de recuperación de genomas virales, es esencial que las muestras sean previamente enriquecidas en partículas virales. Este paso es crucial para asegurar que el contenido viral esté suficientemente representado en el conjunto de datos resultante. La estrategia de enriquecimiento a implementar varía en función del tipo de matriz de la muestra.

En el presente estudio, las muestras consistieron en suspensiones de materia fecal diluidas en PBS. Al no tratarse de tejido, la extracción de ácidos nucleicos no implicó la liberación masiva de material genético del hospedador. Sin embargo, al ser la materia fecal un subproducto biológico naturalmente cargado de microbiota acompañante, su alto contenido bacteriano representa una fuente importante de contaminación genética no viral. Dada la diferencia de tamaño entre bacterias y partículas virales, y considerando que se trabajó con una suspensión líquida, se optó por la utilización de filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm. Esta estrategia permitió reducir significativamente la carga bacteriana, aumentando así la proporción relativa de virus en la muestra antes de proceder a la extracción de ARN.

La eficacia de esta metodología de enriquecimiento puede observarse en dos niveles. En primer lugar, se evaluó mediante RT-qPCR la presencia de BCoV en la muestra 6084, comparando los valores de Ct obtenidos en condiciones con y sin filtrado previo. La muestra no filtrada presentó un Ct de 20,4, mientras que la muestra filtrada arrojó un Ct de 17,5, lo cual indica un aumento significativo en la cantidad relativa de material viral tras el paso de filtración.

En segundo lugar, el impacto de esta estrategia fue aún más evidente en los resultados obtenidos mediante NGS. En ausencia de filtración, solo el 1,8% de los *reads* generados correspondieron a fragmentos del genoma de BCoV, alcanzando una profundidad máxima de lectura de 565. Sin embargo, cuando se incorporó el paso de filtración previo a la extracción de ARN, el porcentaje de *reads* virales aumentó drásticamente al 71,7%, alcanzando una profundidad máxima de 34.536 lecturas (Figura 13). Estos resultados destacan la importancia crítica del paso de filtración en el protocolo de enriquecimiento, especialmente cuando se trabaja con matrices complejas como la materia fecal. Su inclusión resulta determinante para la obtención de genomas virales completos de alta calidad y confiabilidad.

5.2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE BCoV URUGUAYAS

Las seis secuencias de genomas completos de *Bovine Coronavirus* (BCoV) obtenidas en Uruguay en el presente estudio fueron caracterizadas genéticamente en función de la región S1 del gen que codifica la glicoproteína de espiga, utilizando el enfoque filogenético propuesto por Castells et al. (2019), el cual permite la inclusión de secuencias regionales sudamericanas, particularmente de Argentina y Brasil.

Este análisis filogenético reveló que las secuencias uruguayas correspondientes al período 2017–2019 se agrupan dentro de uno de los linajes sudamericanos previamente descritos por dichos autores, el cual incluye secuencias argentinas y uruguayas. En contraste, las secuencias obtenidas en 2024 no se agrupan con ninguno de los linajes sudamericanos conocidos, lo que indica la existencia de un tercer linaje sudamericano de BCoV hasta ahora no reportado. Este linaje está conformado por estas cepas uruguayas con una relación filogenética cercana a cepas de origen europeo, lo que sugiere una ancestría compartida con las cepas circulantes en esa región.

Aunque el grupo del Dr. Castells continúa trabajando activamente en el diagnóstico molecular del BCoV en el país, no lleva a cabo la caracterización genética de los casos positivos. Por lo tanto, este trabajo representa el primer reporte de BCoV en Uruguay desde la publicación realizada en el año 2019 (Castells et al. 2019).

La detección de un linaje de BCoV en Uruguay con afinidad filogenética a cepas europeas plantea interrogantes relevantes sobre su impacto potencial en la dinámica epidemiológica local. La introducción de variantes foráneas puede generar un desplazamiento de linajes autóctonos si presentan ventajas adaptativas como mayor transmisibilidad, escape inmune o tropismo por diferentes tipos celulares. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en otros coronavirus, incluyendo el SARS-CoV-2, y podría replicarse en el contexto del BCoV, afectando la prevalencia, gravedad clínica y distribución geográfica de los brotes (Flores-Vega et al. 2022).

Asimismo, es necesario considerar las posibles vías de ingreso de este linaje al país. La importación de animales vivos o productos biológicos como semen o embriones, el uso

compartido de equipos veterinarios contaminados, e incluso el tránsito informal de animales entre fronteras, constituyen rutas plausibles para la introducción de nuevas variantes virales. Estas vías cobran particular relevancia dada la intensa actividad agropecuaria del país y la interdependencia comercial y sanitaria con la región.

Este contexto refuerza la importancia de implementar estrategias robustas de control sanitario y trazabilidad en los movimientos ganaderos, no solo a nivel nacional, sino también en el marco de una cooperación regional. Contar con un sistema eficiente de monitoreo del origen y desplazamiento del ganado permitiría identificar posibles fuentes de introducción viral y actuar de forma preventiva ante emergencias sanitarias.

La aparición de este nuevo linaje refuerza la necesidad de una vigilancia genómica sostenida que permita detectar tempranamente la introducción y diseminación de nuevas variantes, particularmente aquellas con potencial capacidad de reemplazar linajes locales y modificar el panorama epidemiológico regional.

5.3 ANÁLISIS GENÓMICO DE LAS CEPAS DE BCoV URUGUAYAS

Los dos linajes de BCoV identificados en este trabajo presentan características genómicas claramente diferenciadas. Las cepas más recientes, obtenidas en 2024 y filogenéticamente relacionadas con el linaje europeo, muestran una elevada identidad nucleotídica y aminoacídica con cepas de Europa Occidental en todos los marcos de lectura abiertos analizados. Esto sugiere una fuerte conservación genómica y posible introducción reciente desde dicha región.

En contraste, las secuencias uruguayas correspondientes al período 2017–2019, que integran uno de los linajes sudamericanos previamente descritos, presentan un patrón filogenético que sugiere una naturaleza quimérica. En particular, estas cepas muestran alta similitud con secuencias europeas únicamente en las regiones correspondientes a los ORFs 1a y 1b, mientras que el resto del genoma no mantiene dicha identidad. Este resultado puede ser explicado por la ocurrencia de un evento de recombinación, en el cual uno de los parentales correspondería a una cepa europea, mientras que el otro parental permanece sin identificar.

La no identificación de uno de los parentales no resulta inesperado, dado el escaso número de genomas completos de BCoV actualmente disponibles, especialmente en la región sudamericana. La región hipervariable (HVR) de la proteína S de estas cepas presenta alta similitud con otras secuencias parciales previamente reportadas en Uruguay y Argentina, las cuales podrían corresponder al segundo parental involucrado en el evento recombinante.

Para dilucidar con mayor precisión el origen de estas variantes y caracterizar la dinámica evolutiva de BCoV en la región, resulta fundamental ampliar la base de datos

genómica mediante la secuenciación de más cepas uruguayas pertenecientes a los dos linajes sudamericanos descritos por Castells et al., así como de cepas circulantes en países vecinos como Argentina y Brasil. Esta estrategia permitirá esclarecer los posibles eventos de recombinación, rutas de introducción y evolución local de este virus de importancia veterinaria.

Las cepas uruguayas del 2024 están asociadas monofiléticamente en todos los genes a secuencias irlandesas que provienen de un estudio donde se analizaron 24 muestras de hisopados nasales de terneros durante un brote de enfermedad respiratoria bovina entre 2019 y 2020. En todas las secuencias irlandesas se describieron 10 cambios no sinónimos en el gen de HE respecto a la secuencia prototipo Mebus, utilizada para inmunizar al ganado contra el BCoV (L5P, N49T, S158P, F181L, N214S, S237A, E239Q, V362I, S367P y L392I). En particular, el cambio N214S se encuentra en la región lectina del dominio de unión al receptor (R3-loop), que es crucial para la interacción del virus con su receptor celular. (Dhufaigh et al., 2022). Aunque el estudio no profundiza en los efectos funcionales de esta mutación, otras investigaciones han sugerido que cambios en esta región pueden alterar la afinidad del virus por su receptor y, potencialmente, influir en su capacidad de transmisión y patogenicidad. Sin embargo, se requiere más investigación para comprender completamente el impacto de la mutación N214S en la biología del BCoV.

En ninguna de las cepas uruguayas se detectó el cambio N214S, sin embargo, sí se detectaron otros cambios descritos en este trabajo: L5P, N49T y L392I en todas las cepas uruguayas, y S158P y S367P en las cepas uruguayas de 2024.

La proteína S del coronavirus bovino (BCoV) representa otro de los blancos antigénicos clave del genoma viral. En este análisis, se observó que ni las cepas uruguayas detectadas entre 2017 y 2019, ni las de 2024, se agrupan filogenéticamente con las secuencias prototipo, y presentan una importante divergencia nucleotídica con la cepa vacunal Mebus.

En comparación con la secuencia de Mebus, se identificaron 67 mutaciones no sinónimas en el gen S. De estos cambios, 17 se encuentran dentro de la región que codifica los epítopes antigénicos A y B, definidos por Yoo et al. (1991). Notablemente, el 82% de estas mutaciones están concentradas en la región de alta variabilidad (HVR, por sus siglas en inglés), lo que sugiere una posible presión selectiva en este sitio.

La elevada divergencia en la proteína S, y particularmente en la región HVR que contiene epítopes antigénicos relevantes, podría tener importantes implicancias tanto para la inmunogenicidad del virus como para la eficacia de las vacunas basadas en cepas clásicas como Mebus. Estos cambios podrían afectar el reconocimiento por parte de anticuerpos generados por vacunación, favoreciendo así la evasión inmune, lo que refuerza la necesidad de realizar una vigilancia genómica continua y evaluar la pertinencia de las vacunas actualmente disponibles en el país.

Las proteínas no estructurales *nsp1* y *nsp3* son componentes esenciales en la biología de los coronavirus, desempeñando roles cruciales en la replicación viral y en la modulación de la respuesta inmune del hospedador. En este estudio, se identificaron múltiples mutaciones en estas proteínas en las cepas uruguayas de BCoV en comparación con la cepa vacunal Mebus, lo que sugiere una evolución adaptativa del virus en el contexto local. La proteína *nsp1* es conocida como un importante factor de virulencia en los coronavirus. Su función principal es inhibir la respuesta inmune innata del hospedador. En muchos coronavirus, incluida la cepa SARS-CoV-2, se ha demostrado que *nsp1* bloquea la traducción de ARNm celular y promueve la degradación del ARNm del hospedador, reduciendo así la producción de interferones y otras citocinas antivirales. Cambios en *nsp1* podrían afectar la eficiencia de esta supresión inmune, alterando la virulencia y la dinámica de la infección viral (Narayanan et al. 2015; Rashid et al. 2022).

La proteína *nsp3* contiene hasta 16 dominios, incluyendo una proteasa similar a la papaína (PL^{pro}). PL^{pro} no solo procesa la poliproteína viral, sino que también tiene actividad desubiquitinante y desISGilante, lo que le permite contrarrestar la respuesta inmune innata del hospedador (Báez-Santos et al. 2015).

Las mutaciones observadas en *nsp1* y *nsp3* podrían afectar la capacidad del virus para modular la respuesta inmune del hospedador y para replicarse eficientemente. Por ejemplo, cambios en *nsp1* podrían alterar su capacidad para inhibir la traducción del hospedador y para interferir con la señalización de interferón, mientras que mutaciones en *nsp3* podrían modificar su actividad proteolítica y su capacidad para contrarrestar la respuesta inmune innata. Estas alteraciones podrían influir en la virulencia del virus y en su capacidad para evadir la inmunidad del hospedador. Estos hallazgos también subrayan la necesidad de una vigilancia genómica continua para monitorear la evolución del virus y para evaluar la eficacia de las estrategias de control existentes, incluyendo las vacunas.

6. Conclusiones

- Fue estandarizada una metodología para obtener genomas completos de BCoV a partir de muestras de suspensión fecal mediante tecnología NGS.
- Este trabajo reporta por primera vez la obtención y análisis de genomas completos de Bovine Coronavirus (BCoV) en Uruguay y en la región sudamericana.
- Los seis genomas obtenidos representan un avance significativo frente al limitado número de secuencias completas disponibles a nivel mundial para esta especie viral, contribuyendo de forma sustancial a la caracterización genética y filogenética del BCoV en el continente.
- Las cepas uruguayas de 2017–2019 se agrupan dentro de un linaje sudamericano previamente descrito, mientras que las cepas de 2024 no se agrupan con ningún linaje conocido y presentan alta similitud con cepas europeas. Esto sugiere la existencia de un tercer linaje sudamericano aún no reportado.
- Se detectó un patrón genómico quimérico en las cepas de 2017–2019, con alta similitud con cepas europeas solo en los ORFs 1a/1b, lo que indica la ocurrencia de un evento de recombinación. La falta de identificación del segundo parental sugiere la existencia de variantes locales aún no caracterizadas.
- Se identificaron numerosas mutaciones no sinónimas en el gen de la proteína S respecto a la cepa vacunal Mebus, incluyendo cambios localizados en los epítopes antigénicos A y B. La alta concentración de estas mutaciones en la región hipervariable (HVR) sugiere presión selectiva, con potencial impacto en la evasión inmune y en la eficacia de las vacunas actualmente utilizadas, desarrolladas a partir de cepas prototipo como Mebus.
- Todos nuestros hallazgos resaltan la importancia de implementar programas de vigilancia genómica de uno de los CoVs que afectan animales involucrados en una de las principales actividades económicas del Uruguay.

7. Perspectivas

- Continuar el diagnóstico y caracterización genética de las cepas de BCoV que afectan a los bovinos uruguayos.
- Aplicar la metodología estandarizada para obtener nuevos genomas completos de BCoV. Es prioritario secuenciar más cepas provenientes de diferentes zonas del país y de países vecinos (Argentina, Brasil), lo que permitirá mapear la circulación viral, detectar nuevas introducciones y documentar la dinámica evolutiva del virus.
- Dada la divergencia observada entre las cepas uruguayas y la cepa vacunal Mebus, sería conveniente iniciar estudios de eficacia vacunal, incluyendo pruebas de neutralización cruzada. Los datos generados podrían respaldar el rediseño de vacunas adaptadas a las variantes circulantes localmente.
- Las mutaciones detectadas en genes como S, HE, *nsp1* y *nsp3* merecen estudios funcionales *in vitro* para evaluar su impacto en la entrada viral, evasión inmune y replicación. Esto incluye ensayos de neutralización con sueros vacunales y modelado estructural para predecir cambios en afinidad por receptores o epítomos.

8. Bibliografía

Alekseev, K. P., Vlasova, A. N., Jung, K., Hasoksuz, M., Zhang, X., Halpin, R., Wang, S., Ghedin, E., Spiro, D., & Saif, L. (2008). Bovine-Like Coronaviruses Isolated from Four Species of Captive Wild Ruminants Are Homologous to Bovine Coronaviruses, Based on Complete Genomic Sequences. *J.Virol*, 82(24), 12422–12431. <https://doi.org/10.1128/JVI.01586-08>

Allander, T., Emerson, S., Engle, R., Purcell, R., & Bukh, J. (2001). A Virus Discovery Method Incorporating DNase Treatment and Its Application to the Identification of Two Bovine Parvovirus Species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11609–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.211424698>

Amer, H.M. (2018). Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. *Animal health research reviews*, 19(2), 113-124. <https://doi.org/10.1017/S1466252318000117>

Báez-Santos, Y. M., St John, S. E., & Mesecar, A. D. (2015). The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral research*, 115, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.015>

Bahoussi, A. N., Shah, P. T., Guo, Y.-Y., Liu, Y., & Xing, L. (2023). Evolutionary adaptation of bovine coronavirus (BCoV): Screening of natural recombinations across the complete genomes. *Journal of Basic Microbiology*, 63(5), 519-529.

Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2021). Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses*, 4, 1011-1033. doi:10.3390/v4061011

Bok, M., Miño, S., Rodríguez, D., Badaracco, A., Nuñez, I., Souza, S.P., Bilbao, G., Lounge Uriarte, E., Galarza, R., Vega, C., Odeon, A., Saif, L.J., & Parreño, V. (2015). Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Veterinary Microbiology*, 181(3-4), 221-229. [10.1016/j.vetmic.2015.10.017](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.017)

Brandao, P.E., Gregori, F., Richtzenhain, L.J., Rosales, C.A.R., Villarreal, L.Y.B., & Jerez, J.A. (2006). Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of

the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. *Arch. Virol.*, 151(9), 1735-1748. 10.1007/s00705-006-0752-9

Brieley, I., Digard, P., & Ingils, S. C. (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: Requirement for an RNA pseudoknot. *Cell*, 57(4), 537-547.

Byukusenge, M., Nissly, R. H., Kasibhatla, S. M., Li, L., Russell, R., Springer, H., Barry, R., Saun, R. V., Wolfgang, D., Hovingh, E., Kulkarni-Kale, U., & Kuchipudi, S. V. (2018). Complete Genome Sequences of Four Bovine Coronavirus Isolates from Pennsylvania. *Genome Announcements*, 6(22), e00467-18. 10.1128/genomeA.00467-18

Carman, P.S., & Hazlett, M.J. (1992). Bovine coronavirus infection in Ontario 1990-1991. *The Canadian veterinary journal*, 33(12), 812-814.

Castells, M., Benitez-Galeano, M.J., Marandino, A., Caffarena, R., Casaux, M.L., Pérez, R., Giannitti, F., & Colina, R. (2024). Detection and Genetic Characterization of Bovine Torovirus in Uruguay. *Viruses*, 16(6), 835. <https://doi.org/10.3390/v16060835>

Castells, M., Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C., Castells, F., Victoria, M., Riet-Correa, F., Giannitti, F., Parreño, V., & Colina, R. (2020). Detection, risk factors and molecular diversity of norovirus GIII in cattle in Uruguay. *Infect Genet Evol.*, Dec:86:104613. 10.1016/j.meegid.2020.104613.

Castells, M., Giannitti, F., Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C., Castells, D., Riet-Correa, F., Victoria, M., Parreño, V., & Colina, R. (2019). Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Arch Virol*, 164(11), 2715-2724. 10.1007/s00705-019-04384-w

Cavanagh, D. (1995). The Coronavirus Surface Glycoprotein. In S. G. Siddell (Ed.), *The Coronaviridae* (pp. 73-103). Springer US.

Colina, S.E., Serena, M.S., Echeverría, M.G., & Metz, G.E. (2021). Clinical and molecular aspects of veterinary coronaviruses. *Virus Research*, 297, 198382. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198382>

Daly, G., Bexfield, N., Heaney, J., Stubbs, S., Mayer, A., Palser, A., & Kellam, P. (2011). A Viral Discovery Methodology for Clinical Biopsy Samples Utilising

Massively Parallel next Generation Sequencing. *PLoS ONE* 6, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028879>.

Decaro, N., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Mari, V., Radogna, A., Colaianni, M. L., Cirone, F., Tempesta, M., & Buonavoglia, C. (2008). Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 151, 167–171.

de la Fuente, R., García, A., Santa-Quiteria, J., Luzon, M., Cid, D., García, S., Orden, J.A., & Gómez-Bautista, M. (1998). Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med*, 36(2), 145-152. [10.1016/s0167-5877\(98\)00077-4](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(98)00077-4)

Dhufaigh, K. N., McCabe, M., Cormican, P., Cuevas-Gomez, I., McGee, M., McDanel, T., & Earley, B. (2022). Genome Sequence of Bovine Coronavirus Variants from the Nasal Virome of Irish Beef Suckler and Pre-weaned Dairy Calves Clinically Diagnosed with Bovine Respiratory Disease. *Microbiology Resource Announcements*, 11(11), e0082122. [10.1128/mra.00821-22](https://doi.org/10.1128/mra.00821-22)

Donovan, G.A., Dohoo, I.R., Montgomery, D.M., & Bennett, F.L. (1998). Calf and disease factors affecting growth in female holstein calves in Florida, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 33(1-4), 1-10. [10.1016/s0167-5877\(97\)00059-7](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(97)00059-7)

Flores-Vega, V. R., Monroy-Molina, J. V., Jiménez-Hernández, L. E., Torres, A. G., Santos-Preciado, J. I., & Rosales-Reyes, R. (2022). SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants. *Viruses*, 14(4), 653. <https://doi.org/10.3390/v14040653>

Foster, D., & Smith, G. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 25(1), 13-36. [10.1016/j.cvfa.2008.10.013](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.013)

Frucchi, A.P., Dall Agnol, A., Bronkhorst, D., Beuttemuller, E., Alfieri, A.A., & Alfieri, A.F. (2022). Bovine Coronavirus Co-infection and Molecular Characterization in Dairy Calves With or Without Clinical Respiratory Disease. *Front. Vet. Sci.*, 25(9), 895492. [10.3389/fvets.2022.895492](https://doi.org/10.3389/fvets.2022.895492)

García León, M. L., Carbajal, P., Ángel Ambrocio, A., Valadez, Y., Vásquez, L., Morales, J. A., Cruz, A., Chávez, J. E., Mosqueda, E., Gutiérrez, D., Vilchis, H., Ramírez, I., Perón, L. Á., García, Z., Cortázar, L. A., Velázquez, X., Díaz, J., & Wong, R. (2021). Caracterización genómica y variantes del virus SARS-CoV-2. *Acta méd. Grupo Ángeles*, 19(3), 445-456.

Graham, R.L., & Baric, R.S. (2010). Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. *J Virol*, 84(7), 3134-3146.

Gunn, L., Collins, P. J., O'Connell, M. J., & O'Shea, H. (2015). Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Veterinary Journal*, 68:31. DOI 10.1186/s13620-015-0060-3

Hall, R., Jing, W., Todd, A., Bissielo, A., Yen, S., Strydom, H., & Moore, N. (2014). "Evaluation of Rapid and Simple Techniques for the Enrichment of Viruses Prior to Metagenomic Virus Discovery. *Journal of Virological Methods*, 195, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.035>.

Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem*, 295(37), 12910–12934.

Hasoksuz, M., Alekseev, K., Vlasova, A., Zhang, X., Spiro, D., Halpin, R., Wang, S., Ghedin, E., & Saif, L. J. (2007). Biologic, Antigenic, and Full-Length Genomic Characterization of a Bovine-Like Coronavirus Isolated from a Giraffe. *J. Virol.*, 81(10), 4981–4990. 10.1128/JVI.02361-06

Hasoksuz, M., Sreevatsan, S., Oh Cho, K.-., Hoet, A. E., & Saif, L. J. (2002). Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Research*, 84(1-2), 101-109. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00004-7)

Herrewegh, A., Smeenk, I., Horzinek, M. C., Rottier, P. J., & de Groot, R. J. (1998). Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J. Virol.*, 72(4508–14).

Hurwitz, B. L., Deng, L., Poulos, B. T., & Sullivan, M. B. (2013). Evaluation of methods to concentrate and purify ocean virus communities through comparative, replicated metagenomics. *Environ Microbiol*, 15(5), 1428–1440. 10.1111/j.1462-2920.2012.02836

Instituto Nacional de Carnes (a). (2023). *Exportación*. Recuperado de <https://www.inac.uy/innovaportal/v/23295/10/innova.front/exportacion> en Febrero, 2025.

Instituto Nacional de Carnes (b). (2023). *Consumo de carnes en Uruguay*. Recuperado de <https://www.inac.uy/innovaportal/file/18275/1/cierre-del-consumo-de-carnes.pdf> en Febrero, 2025.

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2019). <https://ictv.global/taxonomy/visual-browser>

Jackwood, M., Boynton, T. O., Hilt, D. A., McKinley, E. T., Kissinger, J., Paterson, A. H., Robertson, J., Lemke, C., McCall, A. W., Williams, S. M., Jackwood, J. W., & Byrd, L. A. (2010). Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. *Virology*, 398, 98–108.

Jeffares, D. C., Tomiczek, B., Sojo, V., & dos Reis, M. (2015). A beginners guide to estimating the non-synonymous to synonymous rate ratio of all protein-coding genes in a genome. *Methods in molecular biology*, 1210, 65-90. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1438-8_4

Kleiner, M., Hooper, L. V., & Duerkop, B. A. (2015). Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-014-1207-4>

Lai, M.M. (1990). Coronavirus: organization, replication, and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 303-333. 10.1146/annurev.mi.44.100190.001511

Lai, M.M., & Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res*, 48, 1-100. 10.1016/S0065-3527(08)60286-9

Lang, Y., Chen, K., Li, Z., & Li, H. (2021). The nucleocapsid protein of zoonotic betacoronaviruses is an attractive target for antiviral drug discovery. *Life Sciences*, 282, 118754. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118754>

Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78–W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>

Lewis, L.D., & Phillips, R.W. (1978). Pathophysiologic changes due to coronavirus-induced diarrhea in the calf. *J Am Vet Med Assoc*, 173(1), 636-642. PMID: 212408.

Li, H., Liu, S.M., Yu, X., Tang, S.L., & Tang, C.K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 55(5), 105951. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105951>

Liu, L., Hagglund, S., Hakhverdyan, M., Alenius, S., Larsen, L. E., & Belák, S. (2006). Molecular Epidemiology of Bovine Coronavirus on the Basis of Comparative Analyses of the S Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 957-960. <https://doi.org/10.1128/jcm.44.3.957-960.2006>

Low, Z.Y., Zabidi, N.Z., Yip, A.J.W., Puniyamurti, A., Chow, V.T.K., & Lal, S.K. (2022). Proteínas no estructurales del SARS-CoV-2 y sus funciones en la evasión inmunitaria del huésped. *Viruses*, 14(9), 1991. <https://doi.org/10.3390/v14091991>

Mao, L., Cai, X., Li, J., Li, X., Li, S., Li, W., Lu, H., Dong, Y., Zhai, J., Xu, X., & Li, B. (2025). Discovery of a novel Betacoronavirus 1, cpCoV, in goats in China: The new risk of cross-species transmission. *PLOS Pathogens*, 21(3), e1012974. [10.1371/journal.ppat.1012974](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012974)

Marandino, A., Hernández, D., Hernández, M., Panzera, Y., Iraola, G., Pereda, A., & Tomás, G. (2015). Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. *Journal of General Virology*, 96(6), 1340–1346. [doi:10.1099/vir.0.000077](https://doi.org/10.1099/vir.0.000077)

Marandino, A., Mendoza-González, L., Panzera, Y., Tomás, G., Williman, J., Techera, C., Gayosso, A., Ramírez, V., Alonso, R., Realpe, M., & Pérez, R. (2023). Genome Variability of Infectious Bronchitis Virus in Mexico: High Lineage Diversity and Recurrent Recombination. *Viruses*, 15, 1581. <https://doi.org/10.3390/v15071581>

Marandino, A., Tomás, G., Panzera, Y., Greif, G., Parodi-Talice, A., Hernández, M., Techera, C., Hernández, D., & Pérez, R. (2017). Whole-genome characterization of Uruguayan strains of avian infectious bronchitis virus reveals extensive recombination between the two major South American lineages. *Infect Genet Evol*, 54, 245–250.

Marandino, A., Vagnozzi, A., Tomás, G., Techera, C., Gerez, R., Hernández, M., Williman, J., Realpe, M., Greif, G., Panzera, Y., & Pérez, R. (2022). Origin of New Lineages by Recombination and Mutation in Avian Infectious Bronchitis Virus from South America. *Viruses*, 14, 2095. <https://doi.org/10.3390/v14102095>

Marsolais, G., Assaf, R., Montpetit, C., & Marois, P. (1978). Diagnosis of viral agents associated with neonatal calf diarrhea. *Can J Comp Med*, 42(2), 168-171.

Martin, D., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>

Martínez, N., Brandão, P. E., Pinheiro de Souza, S., Barrera, M., Santana, N., Díaz de Arce, H., & Pérez, L. J. (2012). Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1870-1878. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.05.007>

Masters, P.S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292. 10.1016/s0065-3527(06)66005-3

McGill, J.L., & Sacco, R.E. (2020). The Immunology of Bovine Respiratory Disease: Recent Advancements. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 36(2), 333–348. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.002>

Mebus, C.A., Stair, E.L., Rhodes, M.B., & Twiehaus, M.J. (1973). Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res.*, 34(2), 145-150 (a).

Mebus, C.A., Stair, E.L., Rhodes, M.B., & Twiehaus, M.J. (1973). Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Vet Pathol.*, 10(1), 45-64. 10.1177/030098587301000105 (b)

Mebus, C.A., White, R.G., Stair, E.L., Rhodes, M.B., & Twiehaus, M.J. (1972). Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. *Vet Med Small Anim Clin*, 67(2), 173–174.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca & Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2024). *Anuario Estadístico Agropecuario 2024*.

Mounir, S., Labonte, P., & Talbot, P. J. (1994). Characterization of the nonstructural and Spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus. *Advances in experimental medicine and biology*, 342, 61–67. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2996-5_10

Nappert, G., Hamilton, D., Petrie, L., & Naylor, J.M. (1993). Determination of lactose and xylose malabsorption in preruminant diarrheic calves. *Can J Vet Res*, 57(1), 152-158. PMID: 8395329.

Narayanan, K., Ramirez, S. I., Lokugamage, K. G., & Makino, S. (2015). Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus research*, 202, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.019>

Osteras, O., Solbu, H., Refsdal, A.O., Roalkvam, T., Filseth, O., & Minsaas, A. (2007). Results and Evaluation of Thirty Years of Health Recordings in the Norwegian Dairy Cattle Population. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4483–4497. [10.3168/jds.2007-0030](https://doi.org/10.3168/jds.2007-0030)

Panzer, Y., Calleros, L., Goñi, N., Marandino, A., Techera, C., Grecco, S., Ramos, N., Frabasile, S., Tomás, G., Condon, E., Cortinas, M. N., Ramas, V., Coppola, L., & Pérez, R. (2022). Consecutive deletions in a unique Uruguayan SARS-CoV-2 lineage evidence the genetic variability potential of accessory genes. *PLoS ONE*, 17(2), e0263563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263563>

Panzer, Y., Ramos, N., Calleros, L., Marandino, A., Tomás, G., Techera, C., Grecco, S., Frabasile, S., Fuques, E., Coppola, L., Goñi, N., Ramas, V., Sorhouet, C., Bormida, V., Burgueño, A., Brasesco, M., Garland, M. R., Molinari, S., Perez, M. T., ... Delfraro, A. (2021). Transmission cluster of COVID-19 cases from Uruguay: Emergence and spreading of a novel SARS-CoV-2 ORF6 deletion. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 116, e210275. [10.1590/0074-02760210275](https://doi.org/10.1590/0074-02760210275) (a)

Panzer, Y., Ramos, N., Frabasile, S., Calleros, L., Marandino, A., Tomás, G., Techera, C., Grecco, S., Fuques, E., Goñi, N., Ramas, V., Coppola, L., Chiparelli, H., Sorhouet, C., Mogdasy, C., Arbiza, J., Delfraro, A., & Pérez, R. (2021). A deletion in SARS-CoV-2 ORF7 identified in COVID-19 outbreak in Uruguay. *Transbound Emerg Dis.*, 68, 3075–3082. <https://doi.org/10.1111/tbed.14002> (b)

Payne, S. (2017). Family Coronaviridae. *Viruses*, Sep 1, 149–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00017-9>

Peck, K.M., Burch, C.L., Heise, M.T., & Baric, R.S. (2015). Coronavirus Host Range Expansion and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Emergence: Biochemical Mechanisms and Evolutionary Perspectives. *Annual review of virology*, 2(1), 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055029>

Penn, W., Harrington, H. R., Schleich, J. P., & Mukhopadhyay, S. (2020). Regulators of Viral Frameshifting: More Than RNA Influences Translation

Events. *Annual Review of Virology*, Volume 7(1), 219-238. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-012120-101548>

Portal GuíaVet. (2023). GuíaVET. Recuperado de <https://guiavet.uy/> en Febrero, 2025.

Quick, J., Grubaugh, N., Pullan, S., Claro, I., Smith, A., Gangavarapu, K., Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T., Beutler, N., Burton, D., Lewis-Ximenez, L., Goes de Jesus, J., Giovanetti, M., Hill, S., Black, A., Bedford, T., Carroll, M., Nunes, M., ... Loman, N. (2017). Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nature protocols*, 12(6), 1261–1276. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>

Rashid F, Xie Z, Suleman M, Shah A, Khan S and Luo S (2022) Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. *Front. Immunol.* 13:940756. doi: 10.3389/fimmu.2022.940756

Rekik, M. R., & Dea, S. (1994). Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. *Arch Virol*, 135, 319-331.

Reyes, A., Semenkovich, N. P., Whiteson, K., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2012). Going viral: next generation sequencing applied to human gut phage populations. *Nat Rev Microbiol.*, 10(9), 607–617. 10.1038/nrmicro2853

Robishaw, J., Alter, S. M., Solano, J. J., Shih, R. D., DeMets, D. L., Maki, D. G., & Hennekens, C. H. (2021). Genomic surveillance to combat COVID-19: challenges and opportunities. *Lancet Microbe*, 2(9), 481-484.

Russell, T., Lozano, J. M., Challinor, C., & Barry, G. (2024). Diversifying selection identified in immune epitopes of bovine coronavirus isolates from Irish cattle. *Journal of General Virology*, 105(8). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.002019>

Saif, L.J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 26(2), 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>

Segovia, K., Icochea, E., González, R., Gherzi, B., & González, A. (2013). Presence of avian influenza virus in wild birds in the wetlands of Puerto Viejo, Lima. *Rev. investig. vet. Perú*, 24(1), 98-103.

Shi, J., Zhao, K., Lu, H., Li, Z., Lv, X., Lan, Y., Guan, J., He, W., & Gao, F. (2018). Genomic characterization and pathogenicity of a porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain isolated in China. *Virus Genes*, 54, 672-683. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1591-y>

Simon-Lorieri, E., & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol*, 9, 617–626. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2614>

Singasa, K., Songserm, T., Lertwatcharasarakul, P., & Arunvipas, P. (2017). Molecular and phylogenetic characterization of bovine coronavirus virus isolated from dairy cattle in Central Region, Thailand. *Tropical Animal Health and Production*, 49, 1523–1529. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1358-9>

Sola, I., Mateos-Gomez, P., Almazan, F., Zuñiga, S., & Enjuanes, L. (2011). RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA-Biology*, 8(2), 237-248. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14991>

Suzuki, T., Otake, Y., Uchimoto, S., Hasebe, A., & Goto, Y. (2020). Genomic Characterization and Phylogenetic Classification of Bovine Coronaviruses Through Whole Genome Sequence Analysis. *Viruses*, 12(2), 183. <https://doi.org/10.3390/v12020183>

Sykes, J. E., & Rankin, S. C. (2013). Isolation in Cell Culture. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 2. [10.1016/B978-1-4377-0795-3.00001-6](https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00001-6)

Tian, P.-F., Jin, Y.-L., Xing, G., Qv, L.-L., Huang, Y.-W., & Zhou, J.-Y. (2014). Evidence of Recombinant Strains of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, United States, 2013. *Emerg Infect Dis*, 20(10), 1735–1738. doi: 10.3201/eid2010.140338

Tidu, A., Janvier, A., Schaeffer, L., Sosnowski, P., Kuhn, L., Hammann, P., Westhof, E., Eriani, G., & Martin, F. (2021). The viral protein NSP1 acts as a ribosome gatekeeper for shutting down host translation and fostering SARS-CoV-2 translation. *RNA*, 27(3), 253–264. doi: 10.1261/rna.078121.120

Urie, N.J., Lombard, J.E., Shivley, C.B., Koprak, C.A., Adams, A.E., Earleywine, T.J., & Garry, F.B. (2018). Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9229-9244. doi:10.3168/jds.2017-14019

Uruguay XXI - Promoción de inversiones, exportaciones e imagen país. Informe Anual de Comercio Exterior de Uruguay (2017-2024). Recuperado de <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/informes-de-comercio-exterior/> en Febrero,2025.

Vijgen, L., Keyaerts, E., Lemey, P., Maes, P., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., & Van Ranst, M. (2006). Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. *Journal of virology*, 80(14), 7270–7274. <https://doi.org/10.1128/JVI.02675-05>

Vlasova, A.N., & Saif, L.J. (2021). Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Front. Vet. Sci*, 31(8), 643220. 10.3389/fvets.2021.643220

Walter-Toews, D., Martin, S.W., & Meek, A.H. (1986). The effect of early calthood health status on survivorship and age at first calving. *Can J Vet Res*, 50(3), 314–317. PMID: 3742366.

Wells, H.L., Bonavita, C.M., Navarrete-Macías, I., Vilchez, B., Rasmussen, A.L., & Anthony, S.J. (2023). The coronavirus recombination pathway. *Cell host & microbe*, 31(6), 874–889. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.003>

Williman, J. (2022). Caracterización genómica mediante técnicas de secuenciación masiva de una cepa del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar. *Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay), Facultad de Ciencias*. Colibri - <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/>.

Windeyer, M.C., Leslie, K.E., Godden, S.M., Hodgins, D.C., Lissemore, K.D., & LeBlanc, S.J. (2014). Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(2), 231–240. 10.1016/j.prevetmed.2013.10.0

Woo, P., Lau, S., Huang, Y., & Yuen, K.-Y. (2009). Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234(10), 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>

Woode, G.N., Bridger, J.C., & Meyling, A. (1978). Significance of bovine coronavirus infection. *Vet Rec.*, 102(1), 15-16. 10.1136/vr.102.1.15

Yang, D., & Leibowitz, J.L. (2015). The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Research*, 206, 120-133. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.025>

Yoo, D., Parker, M. D., Song, J., Cox, G. J., Deregt, D., & Babiuk, L. A. (1991). Structural Analysis of the Conformational Domains Involved in Neutralization of Bovine Coronavirus Using Deletion Mutants of the Spike Glycoprotein S1 Subunit Expressed by Recombinant Baculoviruses. *Virology*, 83, 91-98.

Zhang, X., Hasoksuz, M., Spiro, D., Halpin, R., Wang, S., Vlasova, A., Janies, D., Jones, L. R., Ghedin, E., & Saif, L. (2007). Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology*, 363(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.018>

Ziebuhr, J. (2005). The coronavirus replicase. *Current topics in microbiology and immunology*, 287, 57-94. https://doi.org/10.1007/3-540-26765-4_3

Zyrianova, I. (2020). Phylogenetic analysis of the betacoronavirus S1 subunit. *F1000Research*, 9, 1389. <https://doi.org/10.12688/f1000research.27681.1>

9. Material suplementario

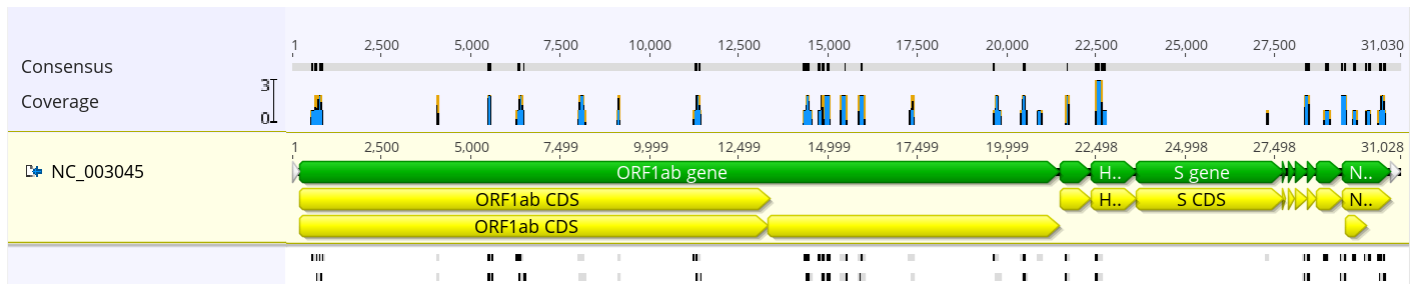
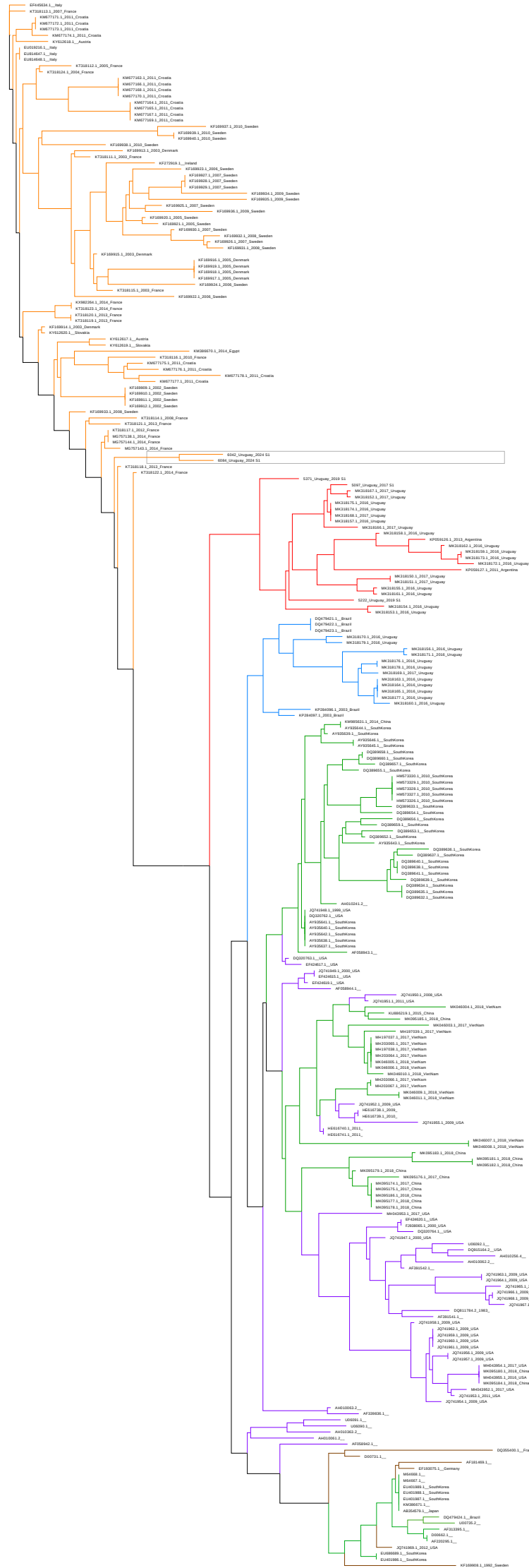


Figura S1. Cobertura del ensamblaje y profundidad de lectura de secuencia en la muestra 6039, no suficiente para ensamblar el genoma de BCoV en dicha muestra.



Tree scale: 0.01

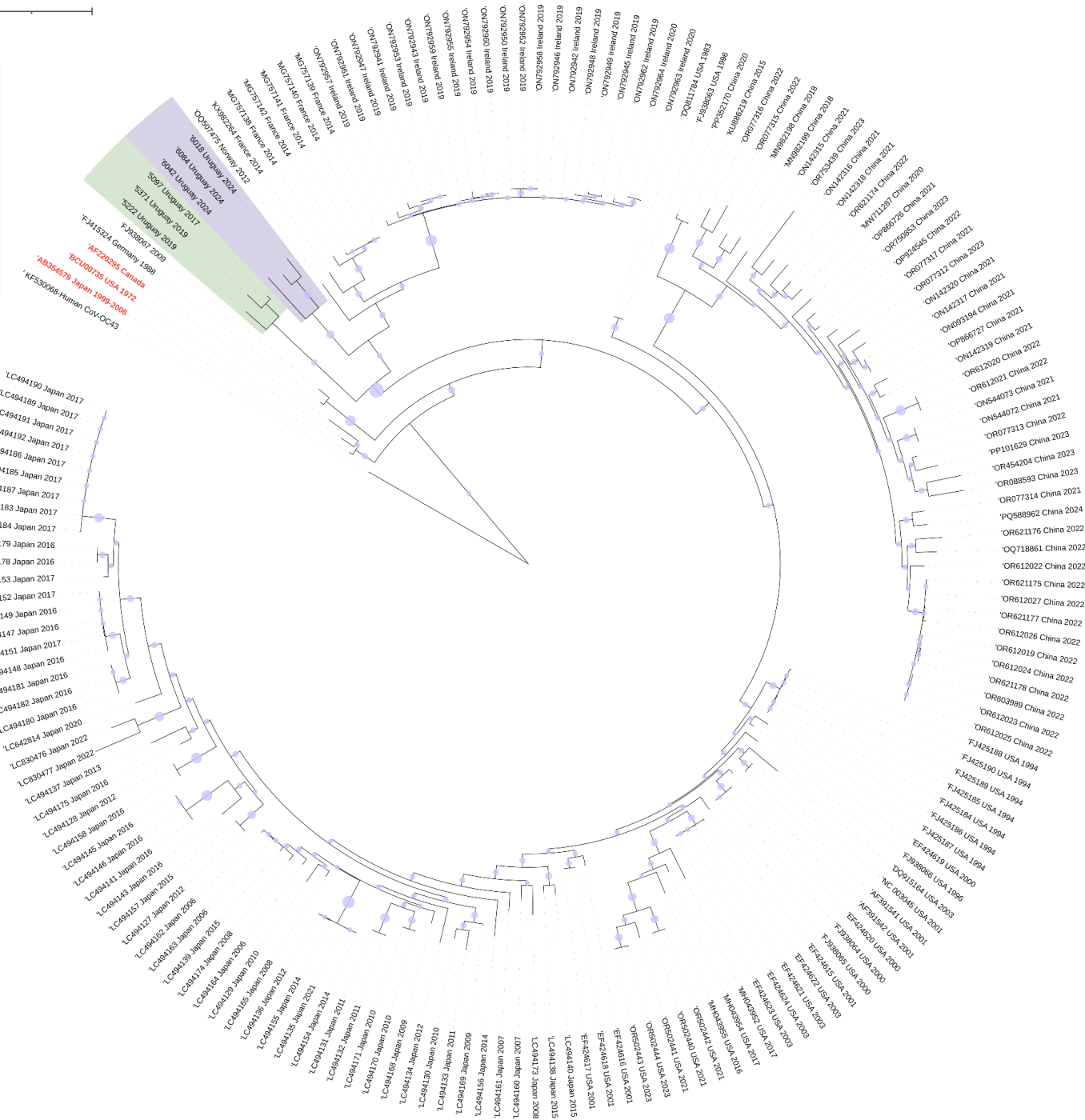
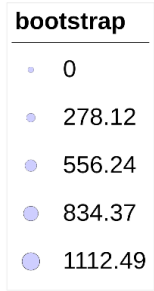


Figura S4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen *pp1ab* de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

Tree scale: 0.01

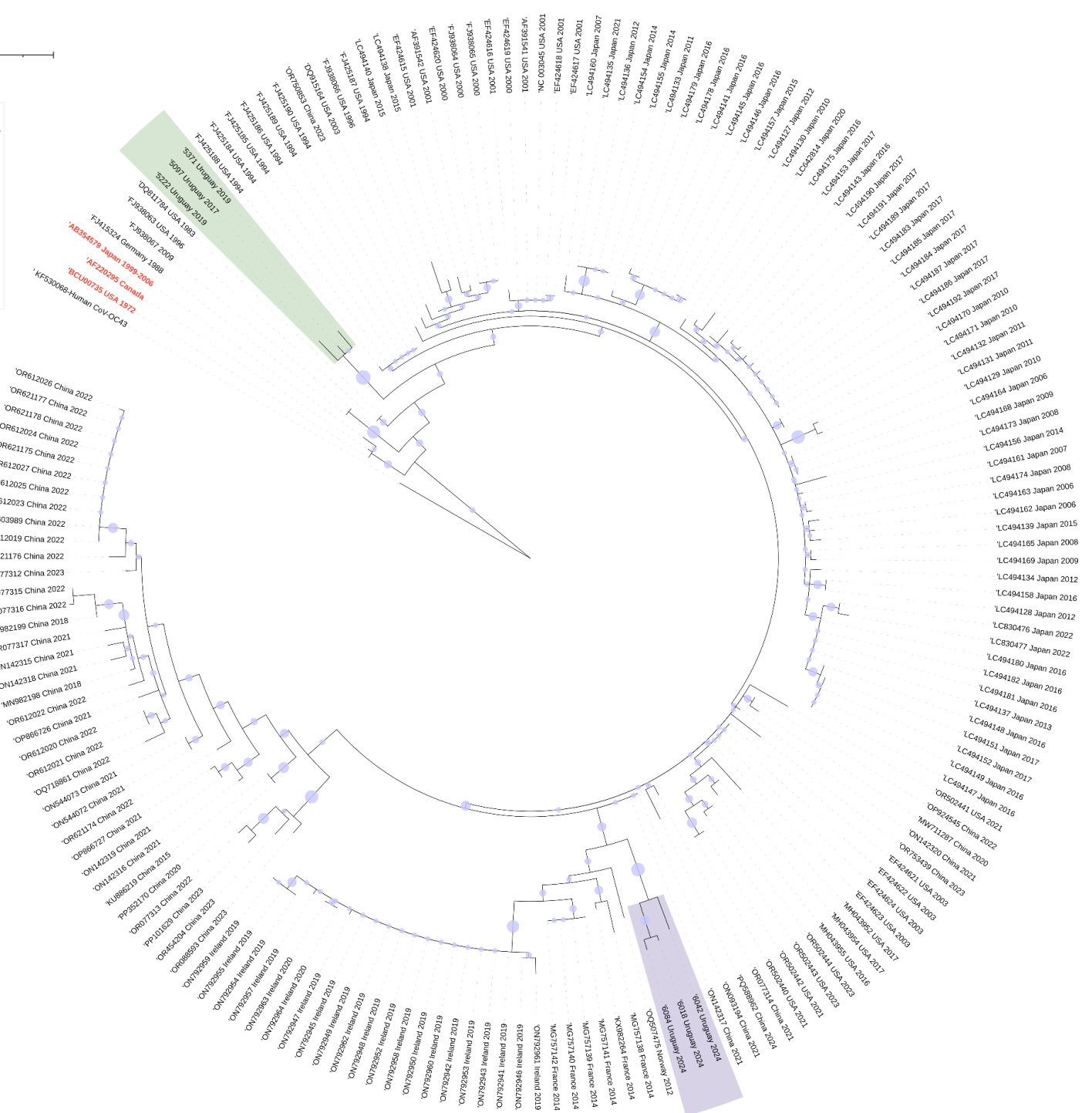
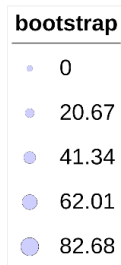


Figura S5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen HE de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

Tree scale: 0.01

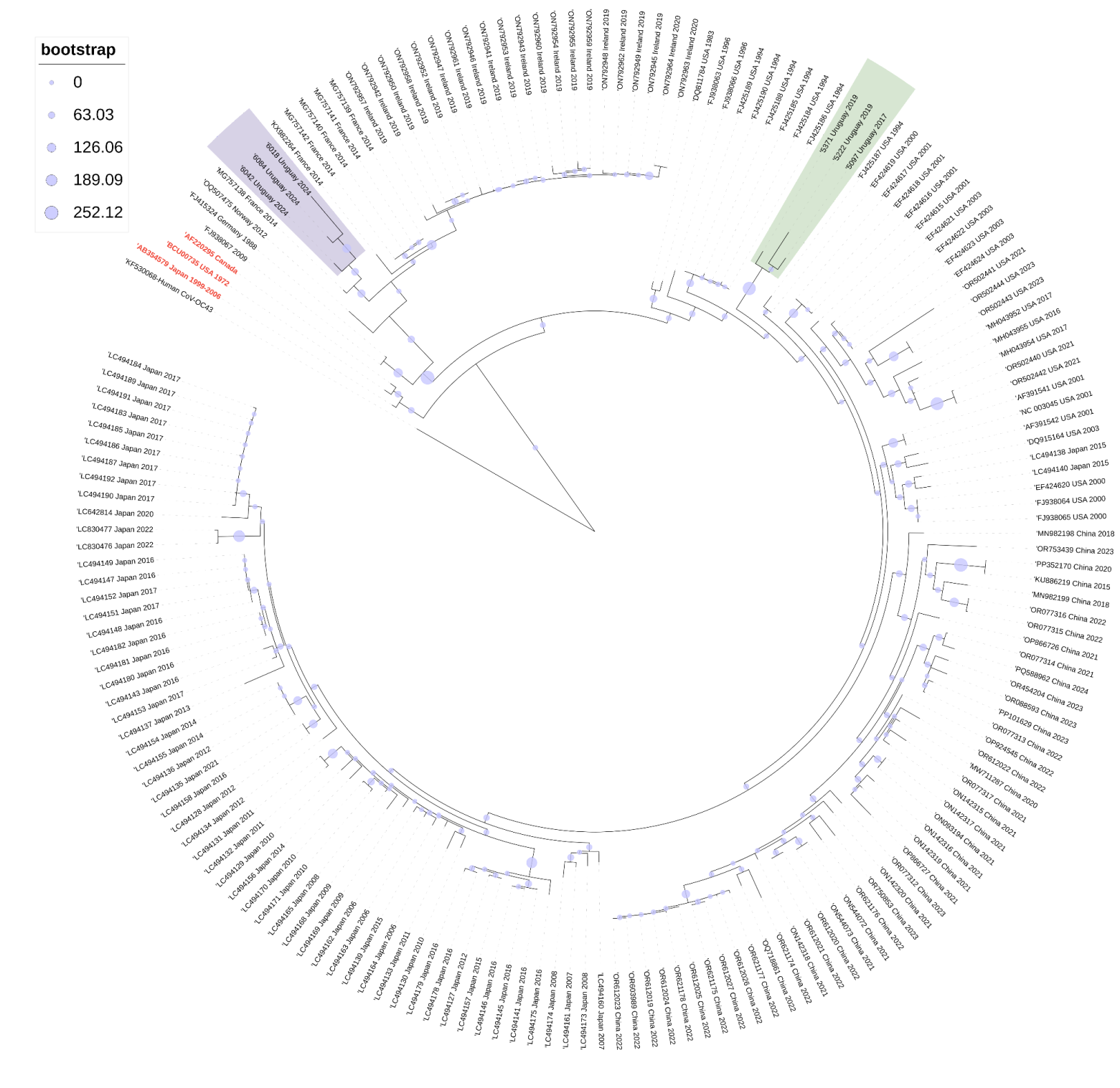
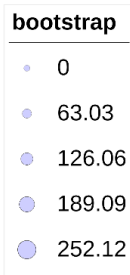


Figura S6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen S de BCov. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).

Tree scale: 0.01

bootstrap

- 0
- 28.93
- 57.86
- 86.79
- 115.71

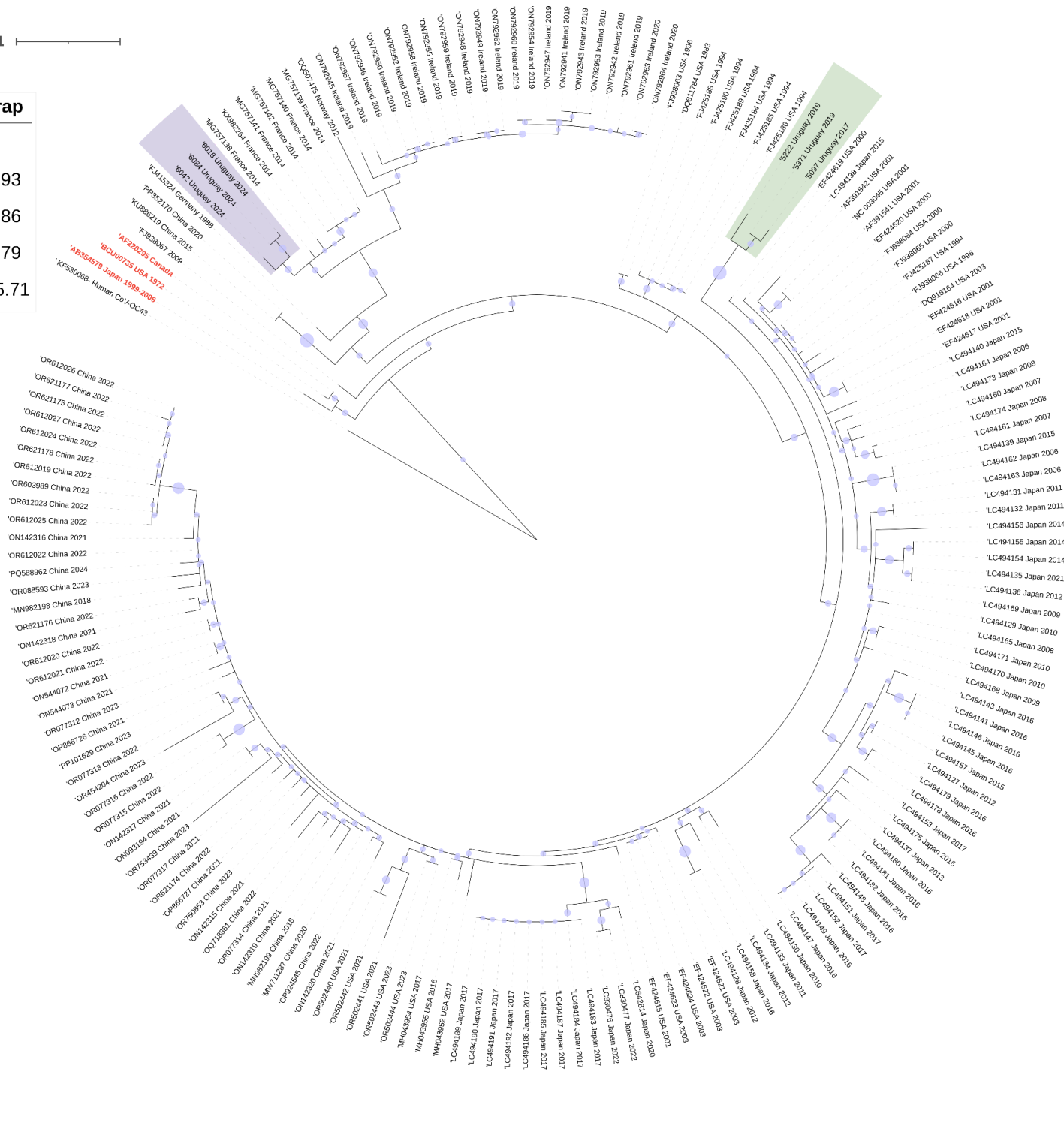


Figura S7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región que abarca los genes E,M y N de BCoV. En violeta se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2024. En verde se resaltan las secuencias uruguayas recolectadas en 2019. Con letras en rojo se señalan las secuencias prototipo Mebus, Kakegawa y Quebec. Figura creada en iTOL (Letunic & Bork, 2024).