

Universidad Nacional de San Martín

Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN, UNSAM) -

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos

de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán” (ANLIS)

Detección y caracterización molecular de coronavirus en murciélagos insectívoros de Argentina

Tesis presentada para optar al título de

Magister en Microbiología Molecular

Autora: Bioq. María Soledad Sabio

Director: Dr. Daniel M. Cisterna

Co-director: Dr. Diego A. Caraballo

Lugar de trabajo: Servicio de Neurovirosis, Instituto Nacional de Enfermedades
Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

A todos los seres que se han cruzado en este camino.

En especial a mi hijo, Rafael.

AGRADECIMIENTOS

Y al fin llegó el día, me toca expresarme en unas líneas debajo de este título. Parecía inalcanzable este día, pero acá estoy sentada en mi hogar, con una taza de café en mano, una tarde del primer día de invierno, llueve, y todo a mi alrededor es calma. Ante tal silencio, me invade una sensación de plenitud indescriptible, porque sí, sepan que antes de llegar hasta acá hubo miles de idas y vueltas.

En medio de una pandemia, fui personal autorizado para transitar y llegar a mi empleo en el servicio de Neurovirosis del Instituto de enfermedades infecciosas Dr. Carlos Malbrán, donde nació este tema de tesis. Mis primeros agradecimientos se los entrego a este lugar, que me dió la oportunidad de estudiar esta maestría, realizar mis prácticas profesionales, desarrollar esta investigación, y además me permitió conocer a un gran compañero y profesional, hoy director de esta tesis, el Dr. Daniel Cisterna, a quien le agradezco por creer en mí, por su paciencia, humildad, su capacidad para guiarme, y su generosidad ante todo, por presentarme a la segunda persona a quien agradezco, el Dr. Diego Caraballo, co-director de esta investigación, quien nunca dudó en participar, en transmitirme su sabiduría y su energía del bien, esa que cuando uno la recibe, dice, sí lo voy a lograr. Gracias.

Luego a mis compañeras del servicio de Neurovirosis, quienes más de una vez tuvieron la voluntad de ayudarme ante una largada que no salía, una línea que no aparecía y también se alegraron conmigo cuando la cosa se iba rumbeando, a Daniela, Aylén, Guadalupe y Stella. Gracias. A la Dra Sara Vladymirsky por su colaboración en los análisis estadísticos de este trabajo. Y a todo el departamento de Virología del instituto, por brindarme la posibilidad de rotar en cada servicio y llevarme una enseñanza de cada uno de ellos.

A mis compañeros de maestría, la cohorte 11. Me llevo colegas amigos y linda gente de todo el país. ¡Vamos! que esta cohorte no para hasta recibir el último título. Gracias por el apoyo y la ayuda diaria.

A mis padres, quienes siempre me demostraron con ejemplo que todo esfuerzo vale la pena. Y que con dedicación y amor las cosas se hacen mejor. Estoy acá, viviendo este presente gracias a ellos. A mis hermanos por ser la red más fuerte que me sostiene y que siempre bancó todas mis ausencias, por motivos de estudio.

A mis suegros, quienes me han demostrado en estos años de elegirnos como familia, que el compañerismo lo es todo. Gracias Dra. Silvia Gonzalez, por sus correcciones.

Gracias Tu, por ser mi compañero de aventuras. Por ser el que confía en mí, y bancar todas esas noches de desvelo porque tenía que escribir la tesis.

El agradecimiento más especial de todos se lo lleva mi hijo Rha, quien gestó conmigo este trabajo, desde la panza hasta hoy. Y gracias al cielo, a esa estrella que me hizo ser la persona que soy.

Este documento ha pasado por muchos lugares y momentos, sin embargo, el desenlace es único y fue gracias a todos ellos.

Sol

C. Keen. Bs. As. Junio 2024.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Familia Coronaviridae.....	12
1.1.1 Generalidades y clasificación.....	12
1.1.2 Estructura de los coronavirus.....	13
1.1.3 Genoma de los coronavirus.....	15
1.1.4 Patogénesis.....	16
1.1.5 Reservorios de los coronavirus.....	17
1.2 Origen de pandemia por SARS CoV-2.....	18
1.3 Los murciélagos.....	19
1.3.1 Su rol como principales hospedadores de CoV.....	20
1.4 Prevalencia y diversidad de CoV en murciélagos del mundo.....	21
1.5 Prevalencia y diversidad de CoV en murciélagos de América.....	22
1.6 Coronavirus en murciélagos de Argentina.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo general.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIALES.....	25
3.1 Muestras.....	25
4. MÉTODOS.....	26
4.1 Procesamiento de la muestra.....	26
4.2 Extracción del ácido nucleico.....	26
4.3 Detección y caracterización molecular del virus.....	26
4.3.1 Detección del virus.....	26
4.3.2 Caracterización molecular.....	28
4.3.3 Secuenciación genética.....	28
4.3.4 Análisis filogenético.....	29
4.3.5 Análisis Estadístico.....	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Detección viral.....	31
5.1.1 Prevalencia.....	31
5.1.2 Variables ecológicas.....	31
5.1.2.1 Distribución geográfica.....	31
5.1.2.2 Distribución temporal.....	32
5.1.3 Variables biológicas: sexo, peso, edad y género.....	33
5.2 Tipificación viral.....	34

5.2.1 Diversidad de CoV.....	34
6. DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
9. ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de Nidovirales.....	12
Figura 2. Ilustración esquemática de una partícula del virus coronavirus.....	13
Figura 3. Organización genómica de los CoV α , β , y δ	14
Figura 4. Alineamiento de las sondas triples con secuencias de cepas de referencia de CoV.....	27
Figura 5. Muestreo según distribución geográfica.....	31
Figura 6A. Distribución temporal de muestras positivas y negativas obtenidas en este estudio.....	33
Figura 6B. Distribución temporal de la tasa de positividad de CoV.....	33
Figura 7. Árbol filogenético de CoV en murciélagos del continente americano.....	36
Figura 8. Árbol filogenético del clado A.....	37
Figura 9. Árbol filogenético del clado B.....	39
Figura 10. Mapa de la República Argentina donde se observan las provincias de muestreo.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Sondas utilizadas en la RT-qPCR marcadas con los diferentes fluoróforos.....	26
Tabla N°2. Cebadores utilizados para la RT-qPCR.....	26
Tabla N°3. Análisis estadístico de las variables biológicas.....	33
Tabla N°4. Tabla resumen de los resultados obtenidos.....	39

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ARN: Ácido ribonucleico

α -CoV: Alphacoronavirus

β -CoV: Betacoronavirus

γ -CoV: Gammacoronavirus

δ -CoV: Deltacoronavirus

ICTV: Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

UniProt: Recursos Proteicos Universales

CoV: coronavirus

S: espiga

N: nucleocápside

E: envoltura

M: membrana

HE: glicoproteína hemaglutinina-esterasa

SARS-CoV: síndrome respiratorio agudo severo

SARS-CoV-2: síndrome respiratorio agudo severo 2

MERS-CoV: síndrome respiratorio del Oriente Medio

MHV: virus de hepatitis de ratón

IBV: virus de bronquitis infecciosa

RNP: ribonucleoproteína helicoidal

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscripción

LNA: locked nucleic acid

RL: regresión logística

TB: *Tadarida brasiliensis*

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CORONAVIRUS EN MURCIÉLAGOS INSECTÍVOROS DE ARGENTINA

RESUMEN

Los murciélagos son los principales hospedadores de coronavirus (CoV) entre los mamíferos. En la actualidad, la alta diversidad de estos mamíferos y su amplia diseminación por todo el mundo, además de su estilo de vida y hábitos, han contribuido en la aparición de una gran variedad de enfermedades emergentes zoonóticas en animales silvestres y domésticos, incluidos los humanos. Por este motivo ha habido un gran interés en identificar nuevos CoV de murciélagos a nivel mundial, ya que esto permite una mejor preparación para una eventual emergencia zoonótica. En este trabajo nos propusimos indagar la prevalencia y la diversidad de los coronavirus que circulan en murciélagos insectívoros de Argentina durante el periodo 2019-2021 y estudiar la asociación entre la positividad de los especímenes y sus variables biológicas y ecológicas. Para realizar esta investigación se analizaron 594 muestras de tejido rectal de murciélagos insectívoros de 8 provincias argentinas, que fueron provistas por el Servicio de Neurovirosis, Departamento de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. La prevalencia estimada resultó del 8,25%, y al estudiar la diversidad mediante el análisis filogenético, detectamos solo miembros del género α -CoV. No encontramos asociación estadísticamente significativa entre la tasa de positividad y las variables biológicas y ecológicas estudiadas. En el análisis gráfico descriptivo absoluto se detectó un pico en los meses cálidos, lo que coincide con una mayor actividad asociada a la estación reproductiva de las poblaciones de murciélagos del hemisferio sur. Debido al impacto que produjeron las últimas enfermedades zoonóticas sobre la salud pública, los CoV generan preocupación. Es por ello que se necesita una vigilancia epidemiológica para minimizar futuros eventos zoonóticos.

Esta investigación contribuye significativamente al entendimiento de la diversidad y la epidemiología de los coronavirus a nivel nacional y regional. En el futuro, podría mejorarse expandiendo el número de especies y áreas estudiadas, así como profundizando en el análisis, mediante la exploración de los aspectos genómicos.

PALABRAS CLAVE: virus, coronavirus, murciélagos, clado.

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CORONAVIRUS IN INSECTIVOROUS BATS OF ARGENTINA

ABSTRACT

Bats are the main hosts of coronaviruses (CoV) among mammals. Currently, the high diversity of these mammals and their wide dissemination throughout the world, in addition to their lifestyle and habits, have contributed to the appearance of a wide variety of emerging zoonotic diseases in wild and domestic animals, including humans. . For this reason, there has been great interest in identifying new bat CoVs worldwide, as this allows for better preparation for an eventual zoonotic emergency. In this work we set out to investigate the prevalence and diversity of coronaviruses circulating in insectivorous bats in Argentina during the period 2019-2021 and study the association between the positivity of the specimens and their biological and ecological variables. To carry out this research, 594 samples of rectal tissue from insectivorous bats from 9 Argentine provinces were analyzed, which were provided by the Neurovirology Service, Department of Virology of the National Institute of Infectious Diseases ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. The estimated prevalence was 8.25%, and when studying the diversity through phylogenetic analysis, we detected only members of the α -CoV genus. We did not find a statistically significant association between the positivity rate and the biological and ecological variables studied. In the absolute descriptive graphic analysis, a peak was detected in the warm months, which coincides with greater activity associated with the reproductive season of bat populations in the southern hemisphere. Due to the impact of recent zoonotic diseases on public health, CoVs generate concern. This is why epidemiological surveillance is needed to minimize future zoonotic events.

This research contributes significantly to the understanding of the diversity and epidemiology of coronaviruses at the national and regional level. In the future, it could be improved by expanding the number of species and areas studied, as well as deepening the analysis, by exploring genomic aspects.

KEYWORDS: viruses, coronaviruses, bats, clade.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Familia Coronaviridae

1.1.1 Generalidades y clasificación

Coronaviridae es una familia de virus envueltos de ácido ribonucleico (ARN) de cadena positiva que infectan a una gran variedad de animales. Estos pertenecen al suborden *Cornidovirineae*, que junto con *Tornidovirineae* pertenecen al orden *Nidovirales* (virus de ARN de cadena positiva envueltos) (Zmasek et al., 2022a). Estudios filogenéticos recientes basados en ARN polimerasas dirigidas por ARN indican que *Nidovirales*, junto con *Picornavirales*, *Caliciviridae*, *Astroviridae* y virus asociados, forman un supergrupo distinto de virus de ARN (supergrupo Picornavirus) (Koonin et al., 2020; Wolf et al., 2018). Los *nidovirales* pueden infectar diferentes hospedadores animales, como insectos, moluscos, crustáceos y vertebrados, lo que indicaría una transferencia horizontal de virus entre distintos *phylla* de metazoos (Dolja & Koonin, 2018).

La familia Coronaviridae es la más numerosa del orden de los Nidovirales (Banerjee et al., 2019), está compuesta por 3 subfamilias, 6 géneros, 28 subgéneros y 54 especies según la última actualización de taxonomía del año 2022 (*Taxon Details | ICTV*, s. f.; Woo et al., 2023) y se divide en dos subfamilias *Letovirinae* y *Orthocoronavirinae*. La subfamilia *Orthocoronavirinae* a su vez está compuesta por los 4 géneros: Alphacoronavirus (α -CoV) y Betacoronavirus (β -CoV), que infectan principalmente a mamíferos, y Gammacoronavirus (γ -CoV) y Deltacoronavirus (δ -CoV), que infectan principalmente a las aves (King et al., 2011; Woo et al., 2012) (**Fig 1**).

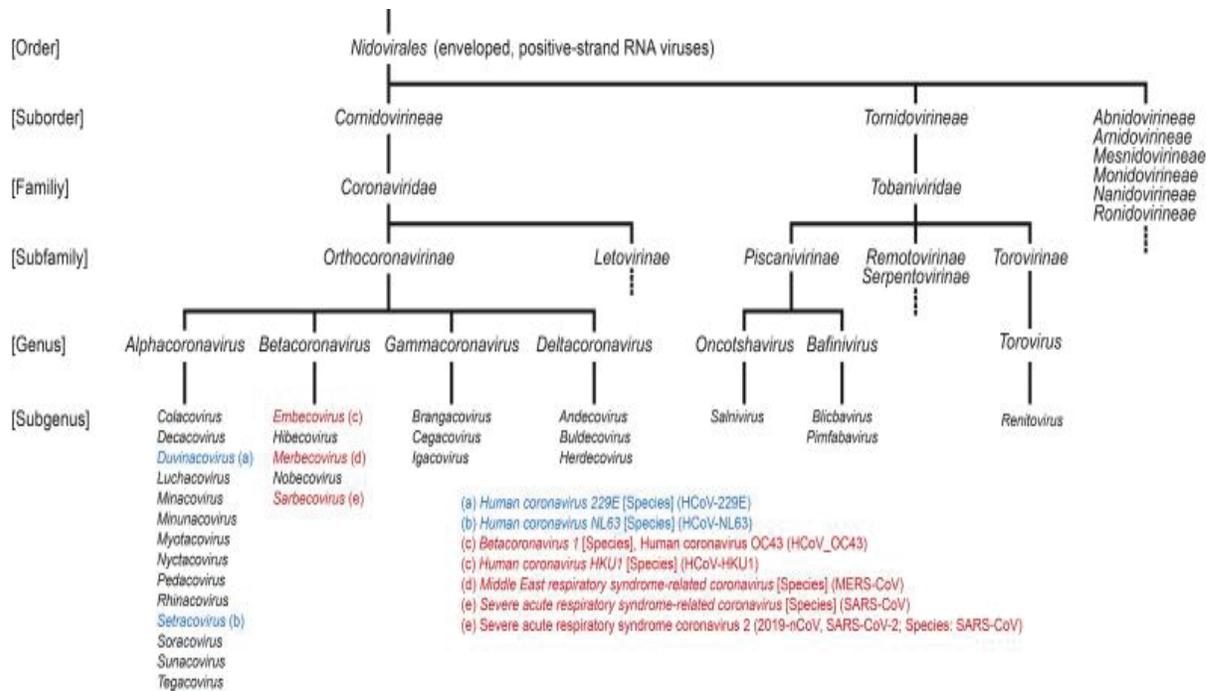


Figura 1. Taxonomía de Nidovirales. Los coronavirus que infectaron a humanos se observan en azul (α -CoV) y en rojo (β -CoV). Taxonomía establecida por el Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (ICTV) y utilizada actualmente por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de EE. UU. y las bases de datos de Recursos Proteicos Universales (UniProt). Su nivel taxonómico se indica entre corchetes (Zmasek et al., 2022).

Los coronavirus (CoV) son virus de ARN envueltos que infectan y causan enfermedades en una amplia gama de especies de aves y mamíferos, incluidos los humanos (Graham & Baric, 2010). Éstos forman una familia monogénica de virus pleomórficos y lábiles al éter. Los viriones tienen un diámetro que oscila entre 60 y 220 nm y una densidad media en sacarosa de 1,18 g/ml. Se caracterizan por tener proyecciones superficiales en forma de maza de unos 20 nm de longitud, de donde el grupo deriva su nombre (en latín *corona*, corona) (Siddell et al., 1983) (**Fig. 2**).

1.1.2 Estructura de los coronavirus

Los viriones de los CoV son partículas virales envueltas, pleomórficas y aproximadamente esféricas con proyecciones superficiales de la proteína espícula (S). La nucleocápside, que comprende la proteína de la nucleocápside (N) y el ARN, parece estar laxamente enrollada, con pequeñas unidades helicoidales distribuidas por todo el interior del virión. Constan de

tres o cuatro proteínas asociadas a la membrana: glicoproteína de espiga (S), envoltura (E) y membrana (M). Una glicoproteína hemaglutinina-esterasa (HE) solo está presente en miembros del subgénero *Embecovirus* del género *Betacoronavirus* (Woo et al., 2023) (**Fig 2**).

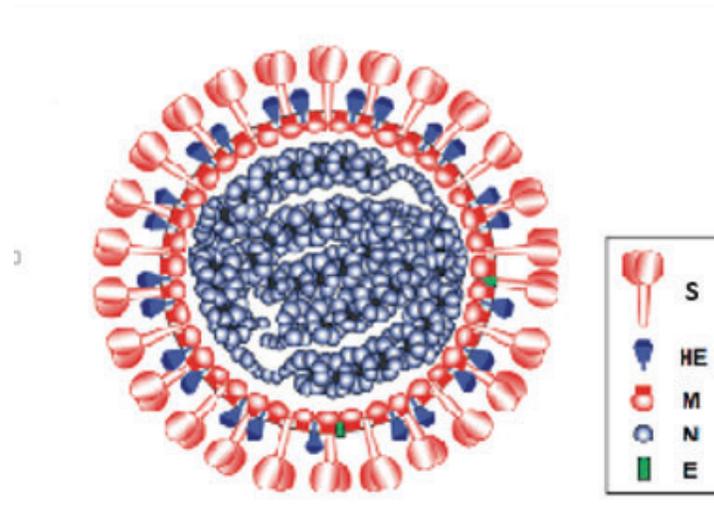


Figura 2. Ilustración esquemática de una partícula del virus CoV. Glicoproteína de espiga (S), envoltura (E) y membrana (M), nucleocápside (N), glicoproteína hemaglutinina-esterasa (HE).

Los CoV dependen de sus proteínas espícula (S) para unirse al receptor de la superficie de la célula huésped durante la entrada a la misma (Y. L. Lau & Peiris, 2005). La proteína S se une al receptor del huésped a través del dominio de unión al receptor (RBD) en la subunidad S1, seguido de la fusión de la subunidad S2 con la membrana celular. Estos CoV difieren principalmente en su mecanismo de entrada al huésped, lo que sugiere posibles cambios en la composición residual de la proteína S que pueden dictar la entrada al huésped (Naqvi et al., 2020b). Diferentes receptores de la superficie celular reconocen al RBD de las proteínas S del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y también las del que causa el síndrome respiratorio del Oriente Medio (MERS-CoV). MERS-CoV reconoce el receptor de dipeptidil peptidasa 4. Mientras que el SARS-CoV y el coronavirus que causa el síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2) reconocen al receptor ACE2 que se une a la proteína S viral.

1.1.3 Genoma de los coronavirus

El genoma de los CoV es un ARN lineal de sentido positivo de 22 a 36 kb con una estructura de cap 5', una cola poliadenilada 3' y una organización genómica típica de 5'-NCR-replicasa-SEM-NCR- 3'. El gen de la replicasa comprende dos grandes ORF superpuestos, 1a y 1b. La traducción del ORF1b está programada por cambio de marco ribosómico -1 y produce las poliproteínas pp1a y pp1ab, que son procesadas adicionalmente por proteinasas codificadas por el virus (**Fig. 3**).

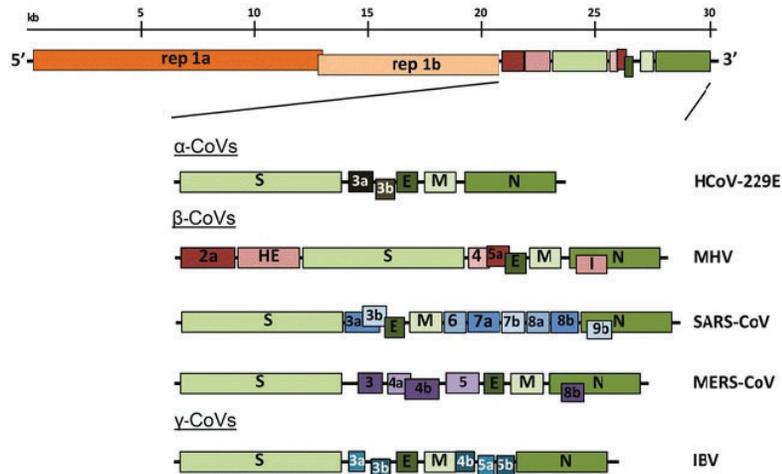


Figura 3. Organización genómica de los CoV α , β , y δ . Las regiones ampliadas muestran las proteínas estructurales y accesorias en las regiones 3' de HCoV-229E (CoV humano), virus de hepatitis de ratón (MHV), SARS-CoV, MERS-CoV, virus de bronquitis infecciosa (IBV) (Fehr & Perlman, 2015a).

El ARN genómico es una molécula infecciosa monocatenaria cubierta y poliadenilada. El peso molecular está entre 5×10^6 y 7×10^6 Da, lo que corresponde a aproximadamente 15.000-20.000 nucleótidos. Los coronavirus tienen característicamente tres tipos de proteínas: una proteína de nucleocápside fosforilada, formando un complejo con el genoma como una ribonucleoproteína helicoidal (RNP); una proteína peplomérica de superficie *N*

-glicosilada, asociada con glicopolipéptidos, que está acilada y es responsable de la unión del virus y la fusión de célula a célula (esta proteína puede eliminarse mediante tratamiento con proteasa); y una proteína de matriz transmembrana, asociada con polipéptidos de peso molecular que tienen grados variables de glicosilación. En el caso de los CoV murinos y bovinos, este polipéptido lleva oligosacáridos unidos *O* -glicosídicamente, y en el caso del IBV, oligosacáridos unidos *N* -glicosídicamente (Siddell et al., 1983).

Estos virus pueden saltar barreras entre especies y adaptarse rápidamente a nuevos hospedadores debido a su gran tamaño genómico, a las altas tasas de recombinación y su plasticidad genómica (Graham & Baric, 2010; Wong et al., 2021).

1.1.4 Patogénesis

En la actualidad se han identificado siete CoV que infectan a los humanos, incluidos cuatro CoV humanos: coronavirus humano HCoV-OC43, coronavirus humano HCoV-229E, coronavirus humano HCoV-NL63, coronavirus humano HCoV-HKU1, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), coronavirus causante del síndrome respiratorio del Oriente Medio (MERS-CoV) y coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2) (*Current ICTV Taxonomy Release | ICTV, s. f.*).

Al igual que el SARS-CoV y el MERS-CoV, también se sabe que el SARS-CoV-2 causa enfermedades respiratorias graves, mientras que otros coronavirus como HKU1, NL63, OC43 y 229E causan síntomas leves (Andersen et al., 2020a). Las partículas de virión ingresan a la célula huésped mediante la unión a través del receptor ACE2. Posteriormente, su genoma (ARN ss) se une a los ribosomas del huésped, lo que da como resultado la traducción de dos poliproteínas grandes y coterminales que se procesan posteriormente mediante enzimas proteolíticas/proteólisis (Wang et al., 2011). La proteólisis mediada por 3CLpro y PLpro (Ton et al., 2020) corta poliproteínas grandes en componentes más pequeños para el plegado y empaquetamiento de nuevos viriones, lo que en consecuencia promueve la propagación de la infección. La proteasa principal es una enzima clave del SARS-CoV-2, que desempeña un papel fundamental en la mediación de la replicación y transcripción viral, lo que la convierte en un objetivo farmacológico atractivo (Shamsi et al., 2020). Otra enzima interesante, RdRp, una replicasa, es esencial para la replicación del genoma viral (Graham et al., 2008). Los CoV influyen en las células huésped por su actividad citocida, así como por mecanismos

mediados por el sistema inmunológico (Suzuki et al., 2020). Muchos estudios revelaron que la infección de CoV produce efectos citopáticos, incluida la apoptosis y la lisis celular. El virus provoca la fusión celular que conduce a la formación de sincicios. Los procesos mencionados anteriormente se observan en la célula debido a la movilización de vesículas para formar el complejo de replicación y la alteración de los complejos de Golgi durante la replicación viral. En comparación con otros CoV como el SARS-CoV y el MERS-CoV, se ha demostrado que ejercen sus efectos citopáticos en las células renales y la formación de sincicios en los tejidos pulmonares.

La patogénesis del SARS-CoV-2 involucra al sistema inmunológico innato y al adaptativo (Morse et al., 2020). Durante la infección viral, las células T y los mensajeros secundarios como las citoquinas desempeñan un papel importante en la progresión de la enfermedad. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) innatos conservados evolutivamente reconocen moléculas asociadas con patógenos o liberadas por células dañadas y están involucradas en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa a la infección por SARS-CoV-2. Además de las células T, se ha reportado que los anticuerpos humorales son cruciales en las infecciones causadas por CoV (Naqvi et al., 2020a).

1.1.5 Reservorios de los coronavirus

Los CoV causan una gran variedad de enfermedades en los animales, y su capacidad para causar enfermedades graves en el ganado y en los animales de compañía, como cerdos, vacas, gallinas, perros y gatos, dio lugar a importantes investigaciones sobre estos virus en la última mitad del siglo XX (Fehr & Perlman, 2015). También, se ha demostrado la patogenicidad en murciélagos y su posterior salto de especie a otros animales, incluido el humano (Woo et al., 2023). Todos los CoV que potencialmente pueden infectar a humanos se originaron a partir de reservorios animales. Cuatro de tales CoV, se transmiten a humanos a través de murciélagos incluyendo los α -CoV 229E y NL63, y los β -CoV, SARS-CoV y MERS-CoV (*ASM Mammal Diversity Database*, 2019). A este último grupo, se sumó recientemente el virus SARS-CoV-2, causante de la enfermedad pandémica COVID-19 (Umakanthan et al., 2020). Diversos estudios sugieren que los murciélagos podrían ser el reservorio del virus SARS-CoV-2, aunque no está claro si otras especies animales podrían haber actuado como intermediarios entre los murciélagos y los humanos. Por este motivo ha habido un gran interés en identificar nuevos CoV de murciélagos, ya que estos son los probables ancestros

del SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV (Fehr & Perlman, 2015a; H. Zhou et al., 2021; P. Zhou et al., 2020).

Desde la epidemia de SARS, se han descubierto muchos otros nuevos CoV de humanos o animales, lo que ha permitido comprender mejor el origen evolutivo de los CoV emergentes. Las características comunes entre estos virus emergentes incluyen la capacidad de causar enfermedades graves en humanos pero no en los hospedadores reservorios y el papel potencial de los hospedadores intermediarios que aumentan las oportunidades de infecciones humanas (Ruiz-Aravena et al., 2022a). En el caso del MERS los dromedarios jugaron el papel de hospedador principal (Chan et al., 2015; de Groot et al., 2013; Reusken et al., 2013). No obstante, se encontró que este virus estaba estrechamente relacionado con los virus Ty-BatCoV HKU4 y Pi-BatCoV HKU5, descubiertos previamente en el murciélago de bambú menor (*Tylonycteris pachypus*) y la pipistrela japonesa (*Pipistrellus abramus*), respectivamente en Hong Kong (Chan et al., 2015).

1.2 Origen de pandemia por SARS CoV-2

A finales de noviembre de 2019, cerca del mercado de Huanan, en Wuhan, provincia de Hubei, China, se describe el primer caso de neumonía por un nuevo CoV, perteneciente al género beta, que inicialmente fue designado 2019-nCoV por investigadores en China. El 11 de febrero de 2020 fue renombrado como SARS-CoV-2 y la enfermedad se denominó COVID-19 (Zapatero Gaviria & Barba Martin, 2023). Este virus se expandió rápidamente por todo el mundo ocasionando la pandemia más importante de los últimos tiempos. La pandemia no sólo tuvo un enorme impacto en la salud pública y la economía mundial, sino que también condujo a cambios radicales en los hábitos sociales y estilos de vida (Decaro & Lorusso, 2020).

El SARS-CoV-2 es un nuevo coronavirus con un probable origen zoonótico, aunque no se han dilucidado con precisión los eventos de contagio. La transmisión de animal a humano se documentó para este y otros coronavirus altamente patógenos, mientras que la transmisión de humano a animal se documentó únicamente para el SARS-CoV-2. Esta transmisión entre especies ha generado preocupación ya que los coronavirus pueden adaptarse fácilmente a su hospedador para volverse más infecciosos y pueden recombinar con coronavirus animales generando nuevos coronavirus con potencial pandémico (Pagani et al., 2023).

Como fuera mencionado previamente, todos los CoV que afectan al ser humano tienen su origen en diferentes animales, que a su vez pueden infectar a otros animales domésticos y también a un humano. Esto se ha demostrado mediante la presencia de anticuerpos en dichos animales (Zapatero Gaviria & Barba Martín, 2023). En el caso del SARS-CoV, el murciélago en herradura, familia *Rhinolophidae*, se consideró hospedador natural y principal reservorio (Lau et al., 2018).

Los estudios iniciales compararon el primer genoma del SARS-CoV-2 con el CoV del murciélago y comprobaron una identidad de secuencia del 96,2%, porcentaje muy alto pero sin llegar a 100 (Zhu et al., 2020). Además, hasta la fecha no se ha señalado con claridad cuál pudo haber sido el animal intermediario. Se cree que el virus ha evolucionado en animales salvajes como la serpiente (*Bungarus multicinctus* y *Naja atra*), el pangolín malayo (*Manis javanica*), la civeta de las palmeras del Himalaya (*Paguma larvata*), la civeta de las palmeras asiática (*Paradoxurus hermaphroditus*), o murciélagos como *Aselliscus stoliczkanus*, *Rhinolophus affinis* y *Rhinolophus sinicus* (C. Li et al., 2020).

1.3 Los murciélagos

Los murciélagos son un grupo único de mamíferos del orden de los quirópteros, integrado por más de 25 familias y más de 1400 especies en todo el mundo, excepto en la Antártida (Anthony et al., 2017a; Wong et al., 2019), y de las cuales unas 300 especies habitan en Sudamérica (Falcón et al., 2011; Wong et al., 2019). Son los únicos mamíferos capaces de mantener vuelo sostenido y son el segundo grupo más grande de mamíferos después de los roedores representando alrededor del 20% de la diversidad de estos. La mayoría de ellos son nocturnos (activos nocturnos) (Decaro & Lorusso, 2020). Viven en grandes poblaciones de millones de individuos con una densidad de hasta 3000 murciélagos/m². Existen pocas especies que se alimentan de sangre animal, la mayoría son frugívoros o insectívoros. En Argentina, a la fecha, se han reportado 67 especies pertenecientes a 29 géneros y cinco familias (Barquez & Díaz, 2020).

Los murciélagos son reservorios de tres de los diez grupos de virus de interés pandémico, según lo designado por la OMS: henipavirus (virus Nipah y virus Hendra), filovirus (virus del Ébola y virus de Marburg) y CoV (Letko et al., 2020). Albergan una multitud de CoV y, debido a su diversidad y amplia distribución, son los principales reservorios de virus

emergentes (Ruiz-Aravena et al., 2022a). Por lo tanto, representan una amenaza potencial para la salud pública debido a su papel como reservorio natural de muchos virus zoonóticos causantes de enfermedades graves.

1.3.1 Su rol como principales hospedadores de CoV

Los murciélagos son los principales hospedadores de CoV y su importancia epidemiológica está atribuida a diversos factores, incluidos:

(1) su longevidad y estilo de vida, pueden vivir relativamente mucho tiempo y volar para cubrir grandes áreas geográficas, lo que permite la propagación viral horizontal y vertical entre los propios murciélagos o entre los murciélagos y los humanos/animales (Olival et al., 2017);

(2) su comportamiento de descanso en grandes cantidades, incluso millones de murciélagos, en cuevas, árboles y también en edificios construidos por humanos aumenta la transmisión viral entre murciélagos y murciélagos-humanos (Chege, 2015);

(3) al ser los únicos mamíferos voladores poseen características metabólicas también únicas. El aumento de su temperatura corporal durante el vuelo se asemeja a la respuesta febril de otros mamíferos y activa el sistema inmunológico. La modificación de su actividad metabólica conduce a la tolerancia de una mayor diversidad de virus coexistentes en su entorno (Canale, 2011; O'Shea et al., 2014);

(4) la relación e interacción coevolutiva entre murciélagos y virus permitió su coexistencia llegando a un equilibrio. Esto permitió que su sistema inmunológico tolerara virus invasores sin expresar ningún signo clínico (permanecen asintomáticos) (Banerjee et al., 2019).

La adaptación del sistema inmunológico de los murciélagos para controlar la replicación viral depende de una mezcla de factores que incluyen sus múltiples inmunoglobulinas, diferentes respuestas de anticuerpos, interferones, interleucinas y citocinas producidos, reconocimiento de receptores e incluso respuestas de células T mediadas por células modificadas (Baker et al., 2013; Skirmuntt et al., 2020).

Todos estos factores convierten a los murciélagos en reservorios de virus ideales comparados con humanos y otras especies de mamíferos. Paralelamente, se informó la coinfección de diferentes coronavirus en un mismo murciélago. La tolerancia de los virus en los murciélagos y la coexistencia de muchos CoV permiten su recombinación, mutaciones y persistencia, lo que contribuye a la evolución de nuevas formas de estos virus (Calisher et al., 2006; Fan et al., 2019; Wang et al., 2011).

Además, también la cría y el comercio de fauna silvestre facilitan la transmisión de virus entre especies al reunir especies en condiciones estresantes y de hacinamiento (Huong et al., 2020; Shivaprakash et al., 2021; Xiao et al., 2021), mientras que otros comportamientos, como la caza y la extracción de guano, facilitan el contacto con patógenos transmitidos por murciélagos. La invasión de hábitats de vida silvestre y de una presión cada vez mayor, producto de la expansión de la población humana, y la intensificación del uso de los recursos naturales, potencian esta problemática favoreciendo las viremias emergentes (Ruiz-Aravena et al., 2022a).

1.4 Prevalencia y diversidad de CoV en murciélagos del mundo

Al momento, se han detectado más de 4.800 secuencias de coronavirus en murciélagos, lo que representa más del 30% de todos los virus de murciélagos secuenciados a nivel mundial. Dado que se han estudiado 543 especies de murciélagos, de una diversidad global de 1.435, para detectar coronavirus, es esperable que la verdadera diversidad de coronavirus de murciélagos sea mucho mayor (Chen et al., 2014).

La diversidad de coronavirus es el resultado de tres razones principales. En primer lugar, la infidelidad de la ARN polimerasa dependiente de ARN de los coronavirus deriva en tasas de mutación del orden de uno por cada 1000 a 10000 nucleótidos replicados, lo que los hace especialmente plásticos. En segundo lugar, como resultado de su cambio aleatorio único de plantilla durante la replicación del ARN, que se cree que está mediado por un mecanismo de "elección de copia", los coronavirus tienen una alta frecuencia de recombinación de ARN homólogo. En tercer lugar, como los coronavirus poseen los genomas más grandes (26,4 a 31,7 kb) entre todos los virus de ARN conocidos, le ha dado a esta familia de virus una plasticidad adicional para acomodar y modificar genes. Estos tres factores no sólo han llevado a la generación de una gran diversidad de cepas y genotipos de una especie de coronavirus, sino también al origen de nuevas especies capaces de adaptarse a nuevos

hospedadores y nichos ecológicos, provocando en ocasiones importantes brotes zoonóticos con consecuencias desastrosas (Woo et al., 2009).

En los estudios realizados durante las últimas décadas en todo el mundo, de los cuatro géneros de CoV conocidos, solo se han detectado α -CoV y β -CoV en murciélagos. En contexto global, se han detectado tanto α -CoV como β -CoV en murciélagos en Asia, Europa, África, Australia, América del Norte y del Sur; pero los α -CoV parecen estar más extendidos que los β -CoV, y su tasa de detección también es más alta (Wong et al., 2019). Estos virus se han detectado tanto en hospedadores murciélagos frugívoros como insectívoros (Drexler et al., 2014).

La diversidad de coronavirus que se encuentran en los murciélagos es alta, con más de 60 especies (más de 4000 secuencias individuales) detectadas en 13 de los 19 subgéneros conocidos de Alphacoronavirus y Betacoronavirus (Wong et al., 2019).

La prevalencia de los coronavirus, estimada por la proporción de murciélagos con ARN viral detectable en las heces o en hisopos fecales u orales, muestra una alta variabilidad temporal y espacial (Ruiz-Aravena et al., 2022b). Aunque las tendencias difieren entre los estudios, se observan consistentemente variaciones estacionales, lo que apunta a posibles roles mecanicistas de la disponibilidad de recursos, los ciclos reproductivos y el comportamiento del hospedador (Baldwin, 2022). A grandes rasgos, la prevalencia de CoV en murciélagos oscila entre el 5% y 25% , con un predominio de α -CoV (Anthony et al., 2017; Bittar et al., 2020; Góes et al., 2013; Moreira-Soto et al., 2015; Wong et al., 2019; Woo et al., 2006, 2009).

1.5 Prevalencia y diversidad de CoV en murciélagos de América

En países del Continente Americano, tales como Brasil, Trinidad y Tobago, Costa Rica, Ecuador, Panamá y México, se observó un predominio de α -CoV, promediando una prevalencia del 7% entre las investigaciones realizadas (Bergner et al., 2021; Bittar et al., 2020; Carrington et al., 2008; Dominguez et al., 2007; Góes et al., 2013, 2016; Lima et al., 2013; Moreira-Soto et al., 2015; Osborne et al., 2011).

En Sudamérica, la mayoría de los estudios se han realizado en Brasil y Perú. En Brasil, se ha detectado un total de cinco linajes de CoV distintos en solo el 10% de los murciélagos locales (15 especies), y la mayoría de ellos pertenecen a α -CoV (Bittar et al., 2020; Bolatti et al., 2020). En 2020, se investigó la presencia de ARN de CoV en murciélagos, que viven en áreas urbanas y periurbanas, de dos regiones de Brasil. En este estudio se reveló la presencia de CoV del género α -CoV en especímenes de ambas regiones (Bittar et al., 2020) al igual que el estudio de Bueno et al. (Bueno et al., 2022) que informa una prevalencia de 9,6% de α -CoV. En Perú, se ha obtenido el genoma completo de α -CoV en el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* (Alves et al., 2021).

1.6 Coronavirus en murciélagos de Argentina

En Argentina no había información acerca de la circulación de CoV en las especies de murciélagos que habitan nuestro país hasta noviembre de 2022 donde se publicó la primera investigación de la cual se desprende esta tesis (Caraballo et al., 2022) donde informamos una prevalencia del 8,25% de CoV pertenecientes al género α -CoV y donde no se han detectado miembros del género β -CoV.

En Febrero de 2023, un grupo de científicos argentinos estudió 361 muestras de murciélagos hematófagos, insectívoros y frugívoros de la región de Yungas, provincia de Jujuy, informando que todas las secuencias virales identificadas pertenecían a miembros del género α -CoV (Lucero Arteaga et al., 2023). Posteriormente, se investigaron muestras fecales de 47 murciélagos provenientes de tres zonas semiurbanas o altamente urbanizadas de la provincia de Santa Fe y se identificaron tres nuevos genomas completos y dos secuencias parciales de α -CoV en *Tadarida brasiliensis*, y cuatro secuencias parciales de α -CoV en *Molossus molossus* (Cerri et al., 2023).

Hasta el momento de la realización de este trabajo de tesis no se encontraron otros reportes sobre CoV en Argentina.

2. OBJETIVOS

En base a los antecedentes desarrollados, en este trabajo nos proponemos estimar la prevalencia y diversidad de CoV en murciélagos insectívoros recolectados entre 2019-2021, así como poder brindar información valiosa con respecto a características ecológicas y epidemiológicas, que hasta el día de la fecha no se han reportado.

Entonces, se plantean los siguientes objetivos para esta tesis:

2.1 Objetivo general

Estimar la prevalencia y diversidad de los coronavirus en murciélagos insectívoros de Argentina.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Estimar la prevalencia de los CoV en murciélagos insectívoros de Argentina recolectados entre 2019-2021.

2.2.2. Determinar la diversidad de los CoV en murciélagos insectívoros de Argentina recolectados entre 2019-2021.

2.2.3. Establecer la influencia de distintas variables biológicas y ecológicas en la positividad de CoV.

3. MATERIALES

3.1 Muestras

Para este estudio se utilizaron 594 muestras de tejido rectal de murciélagos insectívoros de Argentina. Las mismas fueron obtenidas en el periodo 2019-2021 y correspondieron a las siguientes provincias argentinas: Buenos Aires (n=466), La Pampa (n=47), Jujuy (n=6), Salta (n=10), Tucumán (n=2), Neuquén (n=10), Río Negro (n=43) y Chubut (n=10). De la totalidad de las muestras analizadas, 56 fueron únicamente identificadas por provincia, siendo desconocida la localidad.

Las muestras de tejido rectal fueron provistas por el Servicio de Neurovirosis, Departamento de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. El Servicio almacena los murciélagos negativos para el virus de la rabia, que se reciben en el marco de la vigilancia de esta enfermedad realizada por el Centro de Zoonosis de Avellaneda (CZA), provincia de Buenos Aires (BAI); y el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (IZLP), Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Los especímenes se identifican con su número de registro de ingreso, correspondiendo la letra “A”, a aquellas pertenecientes al Centro de Zoonosis de Avellaneda + número-año de recolección y con la letra “P” aquellas remitidas por el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur + número-año de recolección. Además, cada una de ellas dispone de la siguiente información: fecha de recolección, provincia y/o localidad de origen, sexo, peso, edad e identificación taxonómica de cada espécimen (**Ver anexo 1**).

Las especies de murciélagos estudiadas fueron las siguientes: *Tadarida brasiliensis* (n= 385), *Molossus molossus* (n= 68), *Eumops sp.* (n=53), *Myotis sp.*(n=32), *Lasiurus sp.* (n=27), *Dasypterus sp.* (n=16), *Eptesicus sp.* (n=9), e *Histiotus sp.* (n=4).

4. MÉTODOS

4.1 *Procesamiento de la muestra*

Inicialmente, se realizó una suspensión de las muestras de tejido rectal en un buffer que contiene isotiocianato de guanidinio, para lograr lisar la mayor cantidad de células del tejido. Se dejaron en reposo durante 15 minutos, luego se agitaron en un vortex durante 15 segundos, y se centrifugaron 10 minutos a 4°C a 5000 rpm.

4.2 *Extracción del ácido nucleico*

A partir del sobrenadante obtenido luego del procesamiento de la muestra, se realizó la extracción del ARN viral utilizando un kit comercial basado en perlas magnéticas, *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit Thermofisher* (Cat N°A42352) en el equipo automatizado Kingfisher, Thermofisher, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada muestra fue extraída individualmente colocando 140 ul de sobrenadante en cada pocillo de la placa de procesamiento y se utilizaron controles de extracción negativos añadiendo 140 ul de agua de calidad de PCR, y controles de extracción positivos añadiendo 140 ul de una cepa Mebus (diluida 1×10^{-4}), correspondiente a coronavirus bovino, remitida por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) COD FR7-6/IR 302/17.

4.3 *Detección y caracterización molecular del virus*

4.3.1 *Detección del virus*

La búsqueda de CoV se realizó mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscripción (RT-qPCR) (Muradrasoli et al., 2009). Este ensayo multiplex denominado pan-CoV RT-qPCR, se basa en la utilización de tres sondas con LNA (*locked nucleic acid*) (**Tabla N°1**), que están marcadas con diferentes fluoróforos y que cubren las variantes de todos los CoV conocidos a la fecha, permitiendo realizar una clasificación provisional de los CoV detectados. Los LNA, aumentan la temperatura de fusión de las sondas, mejorando de esta manera la afinidad por las secuencias diana (Muradrasoli et al., 2009) (**Fig. 4**).

Sondas	Fluoróforos
SONDA 1: 5'-[ROX]TTG T AT T AT C AGAA TG G YG T S T TTYA T G[EDQ]-3'	ROX
SONDA 2: 5'-[FAM]TGTGTTTCATGTCWARGCWAAATGTTGG[EDQ]-3'	FAM
SONDA 3: 5'-[JOE]T C TA A R T GT T G G GTD G A[EDQ]-3'	JOE

Tabla N°1. Sondas utilizadas en la RT-qPCR marcadas con los diferentes fluoróforos.

La RT-qPCR amplificó un fragmento de 179 pb del gen de la polimerasa viral (RdRp). Las reacciones se realizaron en un equipo ABI 7500 *Applied Biosystems* utilizando el kit *SuperScript III Platinum One-Step* qRT-PCR Kit (Cat N° 11732-020 Invitrogen), utilizando los primers 11-FW (5'-TGATGATGSNGTTGTNTGYTAYAA-3') y 13-RV (5'-GCATWGTRTGYTGNGARCARAATTC-3') (**Tabla N°2**).

Cebadores	Posición en genoma
11-FW: 5'-TGATGATGSNGTTGTNTGYTAYAA-3'	nt 15467–15670
13-RV:5'-GCATWGTRTGYTGNGARCARAATTC-3'	nt 15801 –15825

Tabla N°2. Cebadores utilizados para la RT-qPCR (nt: nucleótidos). Genoma de referencia SARS-TOR2 (n° acceso a Genbank AY274119).

Además la integridad del ARN se comprobó mediante la amplificación de un gen constitutivo, beta-actina, una proteína "housekeeping", presente en casi todas las células de animales. Este paso de amplificación, proporcionó evidencia suficiente sobre la calidad de la muestra para detectar el virus mediante PCR y de esta manera confirmar la ausencia de inhibidores (Arnaout et al., 2023).

```

PTGEV.AF124992.1  CCTATTATCCAGAAATAACCTCTCTTATGTCCTCACTTCTAAGNGTGGGTA5A
FIPV.AF124987.1  CCTATTATCCAGAAATAATGTCCTCATGTCCTCACTTCTAAGTGTGGGTA5A
SARS.AY348314.1  CCTATTATCCAGAAATAAATGTGCTCATGTCCTGAGGCAAAATGTGGGACT5A
BCoV.AF220295.1  TGGTATTATCCAAATAACGTTTCTTATGTCAGAAATCCAAATGTGGGTT5A
PHEV.AF124988.1  TTATTATTATCCAAATAACCTTCTTATGTCAGAAATCCAAATGTGGGTT5A
OC43.AY585229.1  TTATTATTATCCAAATAACGTTTCTTATGTCAGAAATCCAAATGTGGGTT5A
MHV.AF029248.1  TTATTATTATCCAAATAAATGTGCTTATGTCCTGAGGCAAAATGTGGGTA5A
RatSV.AF124990.1  TTATTATTATCCAAATAAATGTGCTTATGTCCTGAGGCAAAATGTGGGTT5A
MHV.AF201929.1  TTATTATTATCCAAATAAATGTGCTTATGTCCTGAGGCAAAATGTGGGTT5A
IBV.AY514485.1  GTCTACTACCCAAATAAATGTCCTTATGTCCTGACTCTAAATGTGGGTT5A
IBV.AY319651.1  CCTTACTACCCAAATAAATGTCCTTATGTCCTGAGGCAAAATGTGGGTT5A
TCV.AF124991.1  GTCTACTACCCAAATAAATGTTTADATGGCTGATTTAAAGTGTGGGTT5A
NL63.AY5188941.1  TGGTATTATCCAGAAATAACCTCTCTTATGTCCTCACTTCTAAGNGTGGGTA5A
CaCoV.AF124986.1  CCTATTATCCAGAAATAAATGTCCTTATGTCCTCACTTCTAAGNGTGGGTA5A
PEDV.AF353511.1  TTGTTATTATCCAGAAATAACCTCTCTCATGAGCGCCCTTAAATGTGGGACT5A
229E.AF304460.1  TTGTTATTATCCAGAAATGGTGTGCTTATGACTACAGCTAAGNGTGGGACT5A

Probe_I      TTGTATTATCCAGAAATGGYGTSTTYATG
Probe_II     TGTGTTCATGTCWGARGCWAAATGTTGG
Probe_III    TCTAARTGTTGGGTDGA

```

Figura 4. Alineamiento de las sondas triples con secuencias de cepas de referencia de CoV. Las regiones conservadas son negras. Las variantes más frecuentes se muestran en gris. Las posiciones variables tienen fondo blanco. Las tres secuencias de sonda con códigos de ambigüedad IUPAC se muestran en la parte inferior, las posiciones LNA están subrayadas (Muradrasoli et al., 2009).

4.3.2 Caracterización molecular

La caracterización molecular de los coronavirus detectados se realizó mediante un segundo ensayo de RT-PCR-*heminested*, que permitió amplificar un fragmento del gen que codifica para la proteína RdRp de aproximadamente 440 pb. El primer round se realizó utilizando el kit *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq high Fidelity DNAPol*, Invitrogen usando los primers F3 (5'-GGTTGGGAYTAYCCHAARTGTGA-3') (nt-15263-15283) y R3 (5'-CCATCATCASWYRAATCATCATA-3') (nt-15673-15696).

En el Segundo round se usaron los primers R3 (5'-CCATCATCASWYRAATCATCATA-3') y F4 (5'-GAYTAYCCHAARTGTGAYAGAGC-3') (nt-15257-15279) tal cual fue descrito por Watanabe y cols. (Watanabe et al., 2010).

4.3.3 Secuenciación genética

La secuenciación nucleotídica se realizó a partir de los productos de amplificación por el método de Sanger (Sanger et al., 1977). Los productos de la amplificación correspondientes a

una porción del gen RdRp (440 pb), se purificaron utilizando la enzima ExoSAP-IT (USB Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se secuenciaron en ambos sentidos utilizando el reactivo *BigDye Terminator Cycle Sequencing* v3.1 (*Applied Biosystems*). La purificación post secuenciación se realizó con el kit comercial *BigDye Xterminator* (*Applied Biosystems*) y la electroforesis capilar correspondiente se realizó en el equipo secuenciador automático ABI3500 *Genetic Analyzer* (Hitachi, *Applied Biosystems*).

4.3.4 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas con ambos primers (F4 y R3) se editaron utilizando el software BioEdit 7.1. Se armaron contigs con ambas secuencias obtenidas con cada primer. Las secuencias fueron alineadas con el programa CLUSTAL X2. Se utilizaron secuencias de referencia de los distintos géneros y subgéneros de CoV de acuerdo a la taxonomía vigente (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, <https://ictv.global/taxonomy/>), que se descargaron de la base de datos Virus Pathogen Resource (<https://www.viprbrc.org/>). Los análisis de distancia se realizaron usando el paquete MEGA 6.0. Para el análisis filogenético se aplicaron métodos bayesianos incluyendo los coronavirus de murciélagos Argentina en el contexto de la diversidad total de coronavirus de murciélagos de las Américas y de un dataset que representa la diversidad global de coronavirus. Para tal fin se estimó el modelo de sustitución molecular con MrModeltest v2 (Nylander, 2004), y se llevó a cabo la inferencia con el programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al., 2012), utilizando el servidor CIPRES (Miller et al., 2015). Se corrió un total de 5E7 generaciones de cadenas de Markov MonteCarlo (MCMC), muestreando cada 5000 generaciones, con el modelo GTR+I+G, descartando el 25% inicial de la corrida (fase de burnin).

Las secuencias de nucleótidos descritas en este documento se han depositado en la base de datos de secuencias de *GenBank*, números de acceso OP169150 a OP169170 (**Anexo 2**).

4.3.5 Análisis Estadístico

Para poder estudiar el objetivo 3 de esta tesis, se realizaron análisis estadísticos considerando las siguientes variables:

Variables biológicas:

- Sexo: masculino/femenino. Se determina con la observación de los órganos genitales del espécimen. Variable categórica.
- Peso (gramos). Se obtuvo durante la identificación taxonómica, pesando a cada espécimen en balanza. Variable cuantitativa.
- Edad: juvenil y adulto. Se define observando la articulación interdigital del 4to o 5to dedo del espécimen. Variable categórica.
- Género: La identificación taxonómica se realizó en el Servicio de Neurovirosis del INEI-ANLIS Dr Carlos G. Malbrán por profesionales expertos, según las claves de identificación de murciélagos neotropicales (Díaz et al., 2021). Variable categórica.

Variables ecológicas:

- Estacionalidad: fecha de recolección, mes y año.
- Distribución geográfica: localidad y provincia.

Los resultados obtenidos se registraron en una planilla y fueron analizados usando herramientas descriptivas de Microsoft Excel y se analizaron con SPSS V 23. Para estudiar la asociación entre la positividad de CoV en las distintas especies de murciélagos insectívoros y las variables biológicas se utilizó regresión logística (RL) univariada. No se realizó RL multivariada dado que ningún p valor de RL univariado resultó menor a 0,200. Se consideró estadísticamente significativo un p valor menor o igual a 0.005.

Para evaluar la asociación con las variables ecológicas se realizó un análisis gráfico-descriptivo.

5. RESULTADOS

5.1 Detección viral

5.1.1 Prevalencia

Se analizaron un total de 594 muestras de tejido rectal de murciélagos insectívoros de Argentina recolectados entre 2019-2021. El virus de CoV se detectó en 49 muestras por PCR en tiempo real para Pancoronavirus, determinando una prevalencia estimada del 8.25%. Todas las muestras positivas fueron detectadas con la sonda 1 y/o sonda 3. Además, se detectó en todas las muestras el gen de la proteína beta-actina como control interno.

En la provincia de Neuquén se detectaron 3 de 10 (30%) especímenes positivos. En Río Negro, se detectaron 5 de 43 (11.63%) murciélagos, en Chubut 1 de 10 (10%), en Buenos Aires 25 (9,12%) de 274 muestras, en CABA 14 de 192 (7,29%) y en La Pampa 1 de 47 (2,13%) especímenes. Finalmente, en las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán no se detectaron murciélagos positivos para CoV.

5.1.2 Variables ecológicas

5.1.2.1 Distribución geográfica

El porcentaje de murciélagos positivos fue, en líneas generales, relativamente similar entre las distintas provincias analizadas y cercano al valor de prevalencia global de 8.25% (**Fig. 5**). Sin embargo en algunos casos se obtuvieron porcentajes de positividad discrepantes. Por ejemplo, en la provincia de Neuquén, donde el porcentaje de positividad es del 30%; hay que tener en cuenta que son pocos individuos analizados y el error en la estimación de la prevalencia es por ende mayor. El mismo sesgo en el cálculo de prevalencia, ocurre en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán, donde se observa una prevalencia de 0%, y esto también podría ser resultado de la poca cantidad de individuos muestreados (**Fig. 5**).

Por el contrario se observa que Buenos Aires fue la provincia más muestreada, con mayor número de especímenes positivos (25), y dentro de la misma la localidad de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), con 14 especímenes positivos para el virus CoV.

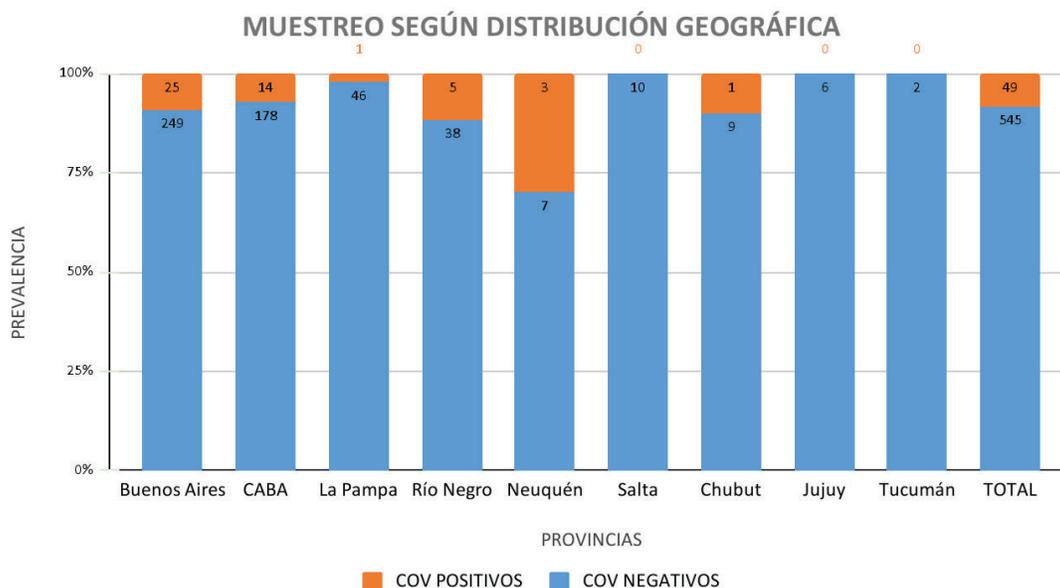


Figura 5. Muestreo según distribución geográfica. En el eje horizontal, se muestran todas las provincias muestreadas. En celeste se indican el número de especímenes negativos para el virus CoV, y en naranja el número de especímenes positivos para CoV.

5.1.2.2 Distribución temporal

El periodo analizado en este trabajo comprende los años 2019, 2020 y 2021. El 86% de las muestras fueron tomadas en el año 2020, por lo que fue el año con mayor número de muestras positivas para CoV. Luego en 2019, se muestrearon el 3% y en 2021 el 11% de las muestras restantes. La mayor cantidad de especímenes de muestreo y positivos se detectaron entre los meses de febrero y abril, siendo el pico máximo en el mes de marzo (**Fig. 6A**).

Según las estaciones del año observamos que dentro del verano (diciembre/marzo) detectamos la mayor cantidad de CoV en murciélagos (n= 22), luego en el otoño (abril/junio) con 7 CoV positivos. Tanto en invierno (julio/septiembre) como en primavera (octubre/diciembre) detectaron 3 muestras positivas. Del total de muestreados, 178 murciélagos no contaban con este dato en su ficha.

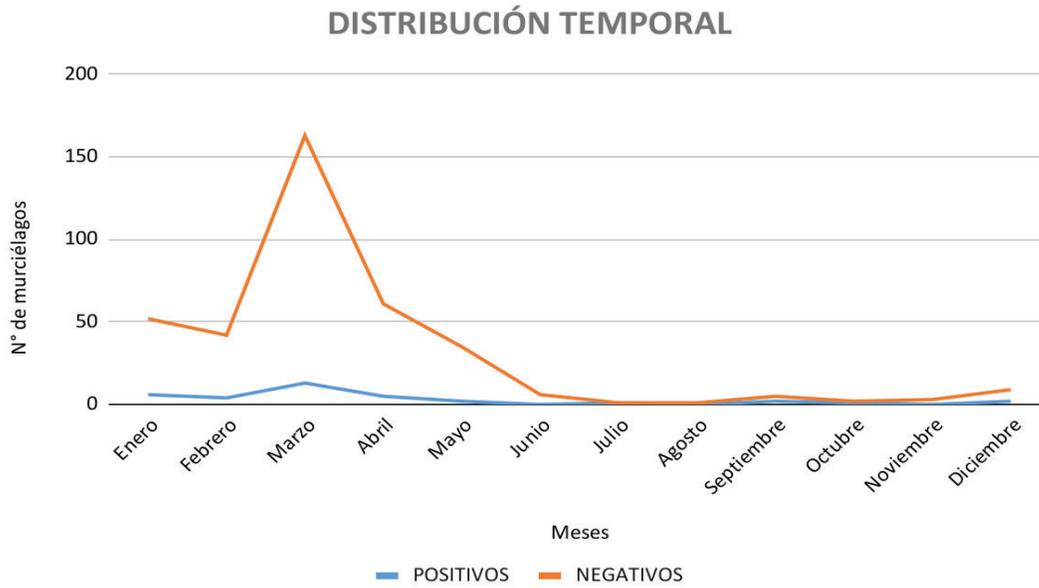


Figura 6A. Distribución temporal de muestras positivas y negativas obtenidas en este estudio. La línea azul indica los especímenes positivos, y la naranja los especímenes muestreados negativos para el virus CoV.

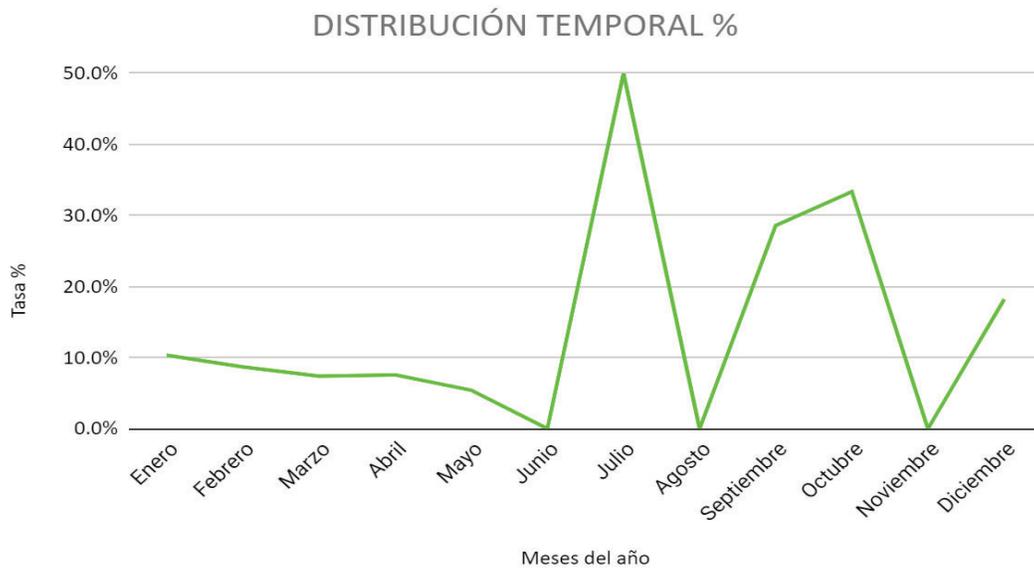


Figura 6B. Distribución temporal de la tasa de positividad de CoV.

5.1.3 Variables biológicas: sexo, peso, edad y género.

La relación entre positividad (P) y las distintas variables ecológicas se muestran en la **tabla N°3**. Se consideraron como variables biológicas el sexo, el peso, la edad y el género de cada espécimen estudiado.

Variable	Categoría	Total	Positivos	Negativos	%	OR	IC 95% (or)	IC 95%	P =
Sexo	Femenino	264	24	240	9.09	1.164	0.648	2.091	0.611
	Masculino	316	25	292	7.91	(ref)			
Peso (grs)	Media	11.73	10.69	11.81	-	0.957	0.892	1.027	0.223
Edad	Adulto	472	42	430	8.90	1.605	0.702	3.666	0.262
	Juvenil	122	7	115	5.74	(ref)			
Género	<i>Dasypterus</i>	16	2	14	12.50	1.475	0.322	6.762	0.617
	<i>Eptesicus</i>	9	0	9	-	0	0		0.999
	<i>Eumops</i>	53	2	51	3.77	0.405	0.094	1.736	0.224
	<i>Histiotus</i>	4	0	4	-	0	0		0.999
	<i>Lasiurus</i>	27	0	27	-	0	0		0.998
	<i>Molossus</i>	68	8	60	11.76	1.376	0.608	3.117	0.444
	<i>Myotis</i>	32	3	29	9.38	1.068	0.309	3.689	0.917
	<i>Tadarida</i>	385	34	351	8.83	(ref)			

Tabla N°3. Análisis estadístico de las variables biológicas. Se presenta el número de casos positivos y negativos, el porcentaje de positivos, *odd ratio* (OR), el intervalo de confianza (IC), y el valor P. Se consideró estadísticamente significativo un P valor menor o igual a 0.005.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la positividad para CoV y ninguna de las variables biológicas analizadas. No se realizó RL multivariada dado que ningún P valor de RL univariado resultó menor a 0,200.

5.2 Tipificación viral

5.2.1 Diversidad de CoV

De las 49 muestras positivas por RT-qPCR, se pudieron obtener 21 secuencias parciales de una longitud de 389 a 576 pb del gen que codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (posición 1851 a 2426). Las diferencias en el tamaño de los amplicones se deben a que el primer R3 en algunos casos se adhiere a la hebra molde en dos posiciones alternativas, produciendo un fragmento corto (389 pb) o uno largo (576 pb). No se han podido secuenciar el 100% de las muestras detectadas debido a las diferencias entre la sensibilidad y especificidad en las PCR utilizadas. La PCR real time multiplex utilizada para la detección fue más sensible que la PCR heminested que se utilizó para la caracterización molecular. Esto es atribuible a que la PCR real time está dirigida a un fragmento más corto de aproximadamente 179 pb y es realizada en solo 1 paso. En cambio, la PCR heminested, que es la técnica utilizada para la posterior secuenciación, se dirige a un segmento más largo, de aproximadamente 440 pb, que requiere mayor integridad para el éxito en la amplificación y también al ser en 2 pasos, se aumenta la posibilidad de amplificar segmentos específicos, los cuales resultaron secuencias parciales defectuosas y por ese motivo fueron excluidas de esta investigación. Todos los CoV detectados fueron α -CoV. Las secuencias fueron utilizadas para los posteriores análisis filogenéticos.

En el análisis filogenético se observó que los CoV detectados en este trabajo se agrupan en dos clados A y B dentro del género α -CoV (**Fig. 7**), en la figura se observan también los siete clados del A al G descritos en la bibliografía anteriormente entre los α -CoV de murciélagos americanos (Caraballo, 2022).

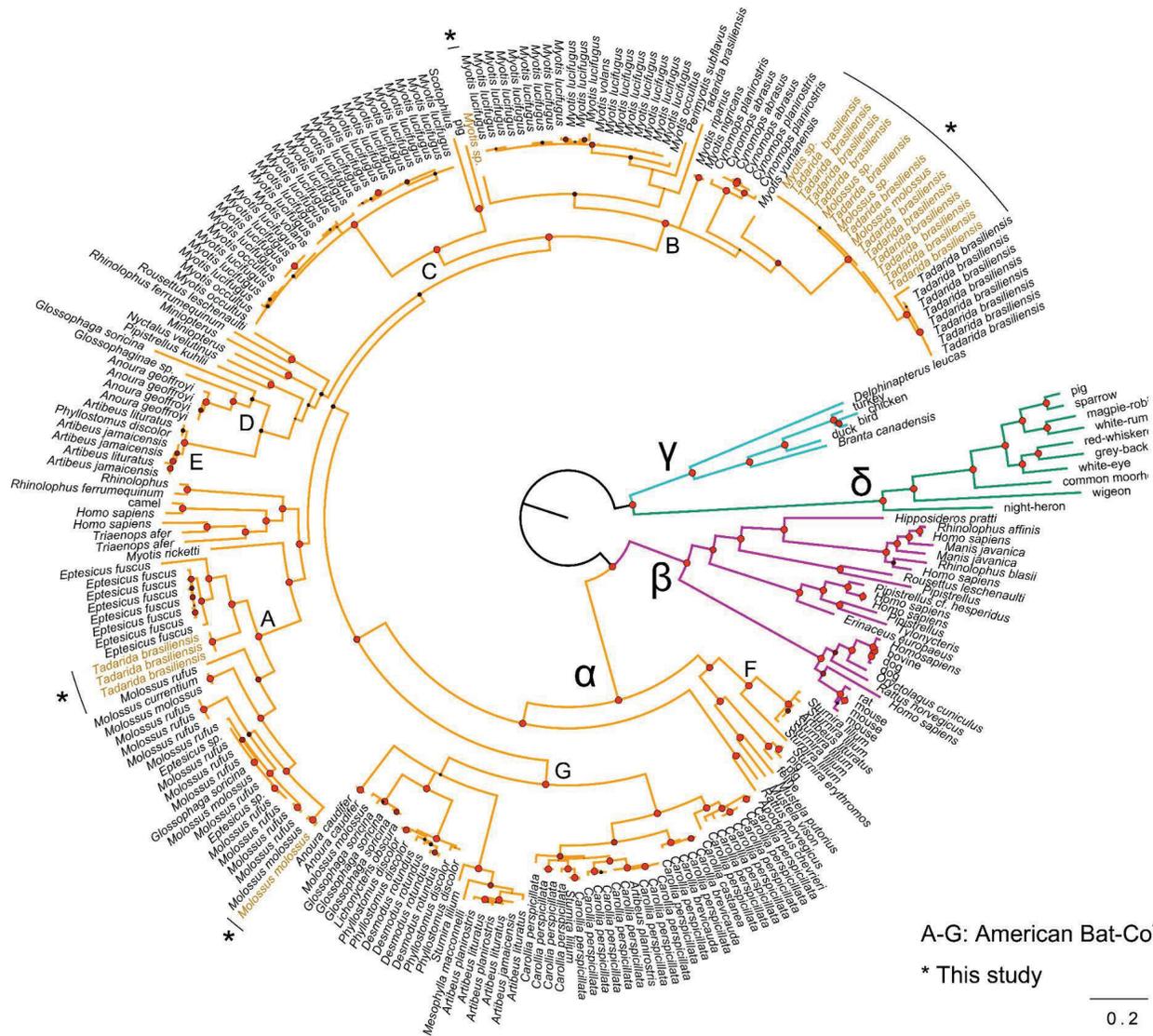


Figura 7. Árbol filogenético de CoV en murciélagos del continente americano. Se observan los 4 géneros conocidos Alphacoronavirus (α -CoV) en color amarillo, Betacoronavirus (β -CoV) en color fucsia, Gammacoronavirus (γ -CoV) en color celeste y Deltacoronavirus (δ -CoV) en color verde. A su vez en el género α -CoV, se señalan los 7 clados existentes de la A-G. Las secuencias obtenidas en este estudio se muestran con un asterisco (*).

En el clado A observamos 2 linajes, uno compuesto mayoritariamente por murciélagos del género *Molossus* de Brasil, a los que se agregan los de Argentina (este trabajo), y el otro linaje con variantes de *Tadarida brasiliensis* (TB) argentinas descubiertas en este estudio, que se asocian con un clado de *Eptesicus fuscus* de EEUU (**Fig. 8**).

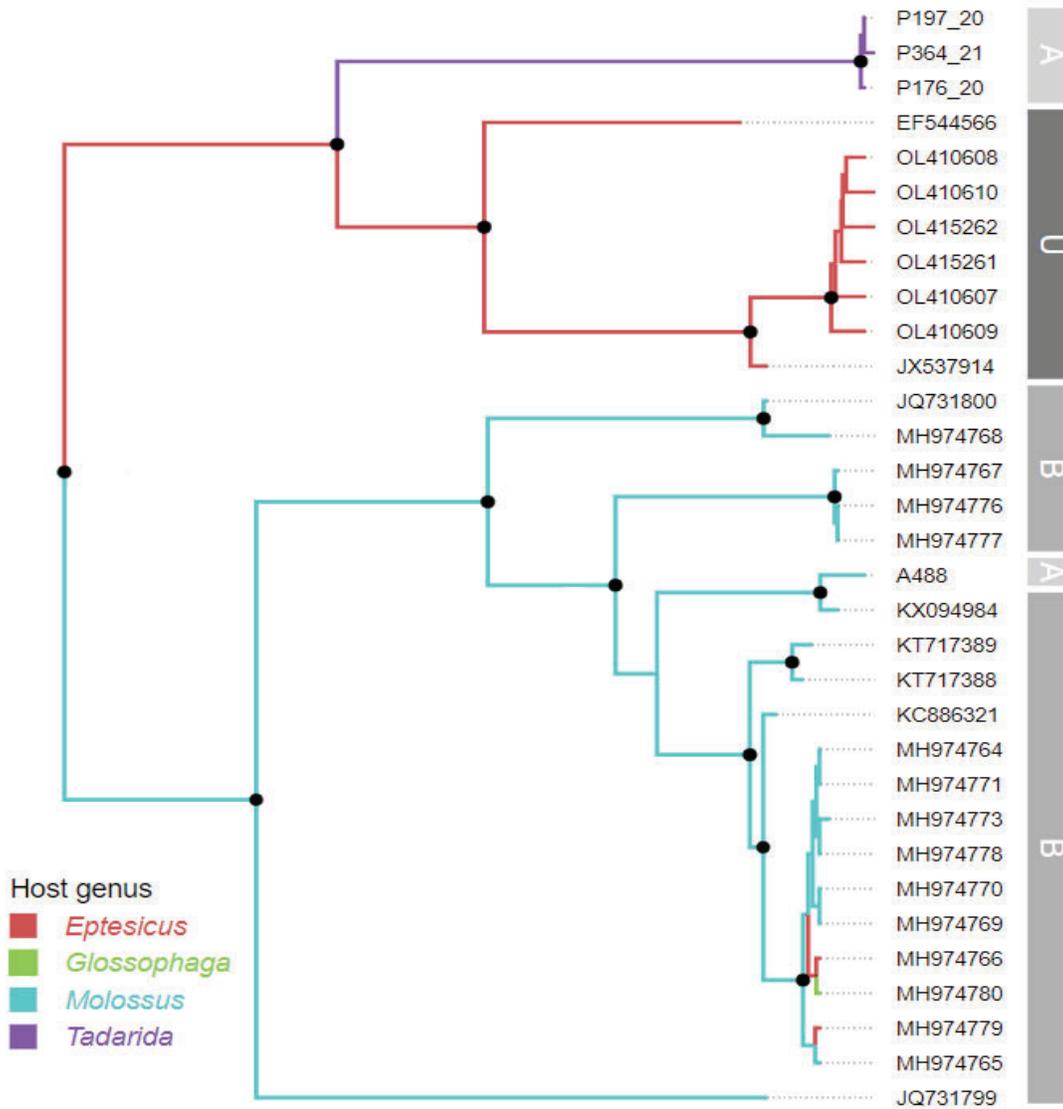


Figura 8. Árbol filogenético del clado A. Se observan todas las secuencias que componen este clado, incluidas *Molossus* y *Tadarida brasiliensis*, detectadas en este estudio. Los rectángulos grises a la derecha del árbol indican el país donde fueron detectadas (A, Argentina; B, Brasil; U, Estados Unidos).

Dentro del clado B, podemos observar un subclado que está compuesto predominantemente por la especie *T. brasiliensis*, de Brasil y EEUU, relacionados con los CoV detectados en murciélagos argentinos (este estudio) que parecen mantener una misma variante. Aquí mismo, la muestra A479, perteneciente a la especie *Myotis* sp, se encuentra relacionada dentro de este subgrupo compuesto por TB argentinos, lo que explicaría un posible spillover del virus CoV. Además, las 3 muestras pertenecientes a *Molossus*, se relacionan entre sí formando un grupo monofilético dentro del clado de *Tadarida* lo que indicaría un salto de hospedador (**Fig. 9**).

De la misma manera en este clado, se observa la muestra P207-20 de *Myotis* sp argentino relacionado dentro de otro subclado compuesto por todos los *Myotis* sp de Canadá y EEUU. Es destacable el gran largo de ramas entre la muestra argentina y las de Norteamérica, que indica que aún cuando quedan agrupadas tienen un alto grado de divergencia genética.

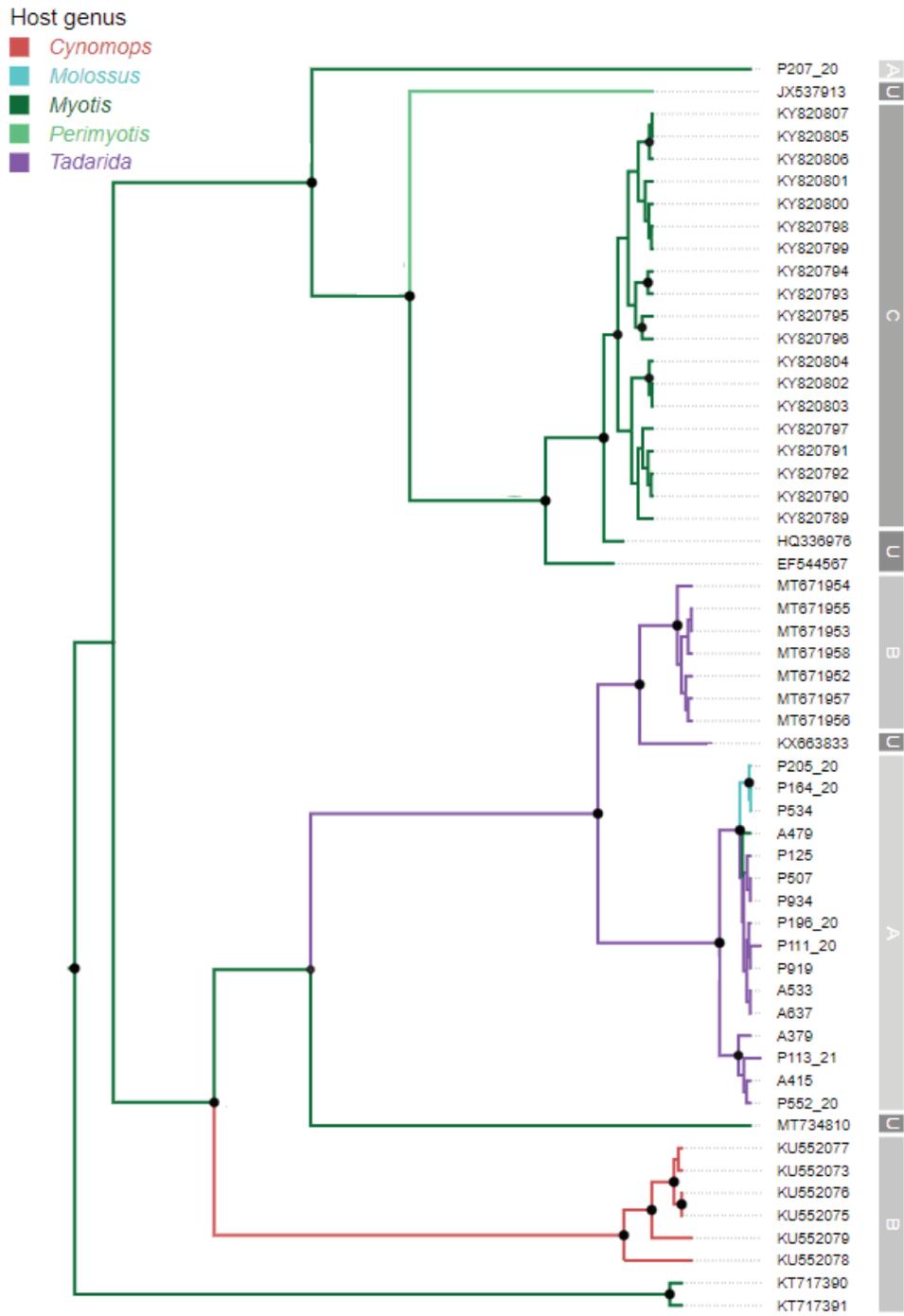


Figura 9. Árbol filogenético del clado B. Se observan todas las secuencias que componen este clado, incluidas *Molossus*, TB y *Myotis*, detectadas en este estudio. Los rectángulos grises a la derecha del árbol indican el país (A, Argentina; B, Brasil; C, Canadá; U, Estados Unidos).

Los resultados de este trabajo se muestran en la siguiente tabla:

Familia	Género	Especie	RT		HN	Filogeni a	Clado
			N° testeadas	N° detectadas	N° secuencias		
Vespertilionidae	<i>Dasypterus</i>	<i>ega</i>	16	2 (S3)	0	-	-
Molossidae	<i>Eumops</i>	<i>patagonicus</i>	4	0	0	-	-
Molossidae	<i>Eumops</i>	<i>glaucimus</i>	1	0	0	-	-
Molossidae	<i>Eumops</i>	<i>bonaerensis</i>	6	1 (S1)	0	-	-
Molossidae	<i>Eumops</i>	<i>sp.</i>	42	1 (S1-3)	0	-	-
Vespertilionidae	<i>Eptesicus</i>	<i>diminutus</i>	5	0	0	-	-
Vespertilionidae	<i>Eptesicus</i>	<i>furinali</i>	4	0	0	-	-
Vespertilionidae	<i>Lasiurus</i>	<i>blossevilli</i>	15	0	0	-	-
Vespertilionidae	<i>Lasiurus</i>	<i>cinereus</i>	8	0	0	-	-
Vespertilionidae	<i>Lasiurus</i>	<i>sp.</i>	4	0	0	-	-
Vespertilionidae	<i>Histiotus</i>	<i>sp.</i>	4	0	0	-	
Molossidae	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	68	10 (S1-3/S3)	4	α -CoV	A y B
Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>sp.</i>	30	3 (S1-3)	2	α -CoV	B
Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>levis</i>	2	0	0		-
Molossidae	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	385	32	15	α -CoV	A Y B

Tabla N°4. Tabla resumen de los resultados obtenidos. Número de especímenes estudiados en este trabajo, incluido familia, género y especie; diversidad y clado. Número de secuencias obtenidas y entre paréntesis (X) se describe la sonda (S1: sonda 1, S3: sonda 3) con la cual fue positivo por el primer método de detección para Pancoronavirus qRT-PCR. RT: Real Time. HN: hemi-nested.

Aquellas provincias que tuvieron especímenes con CoV positivos se muestran en la **figura 10** y dentro de ellas observamos gráficos de torta indicando la diversidad de los CoV. Se observa que la mayoría fueron del clado B (color naranja). En Neuquen, Rio Negro y La Pampa la diversidad fue 100% del clado B. En la provincia de Buenos Aires, y específicamente en la localidad de CABA se observa un resultado similar con respecto a que la mayoría son del

clado B, pero también podemos encontrar una minoría de clado A (color azul). En cambio, en la provincia de Chubut, la diversidad fue 100% del clado A.

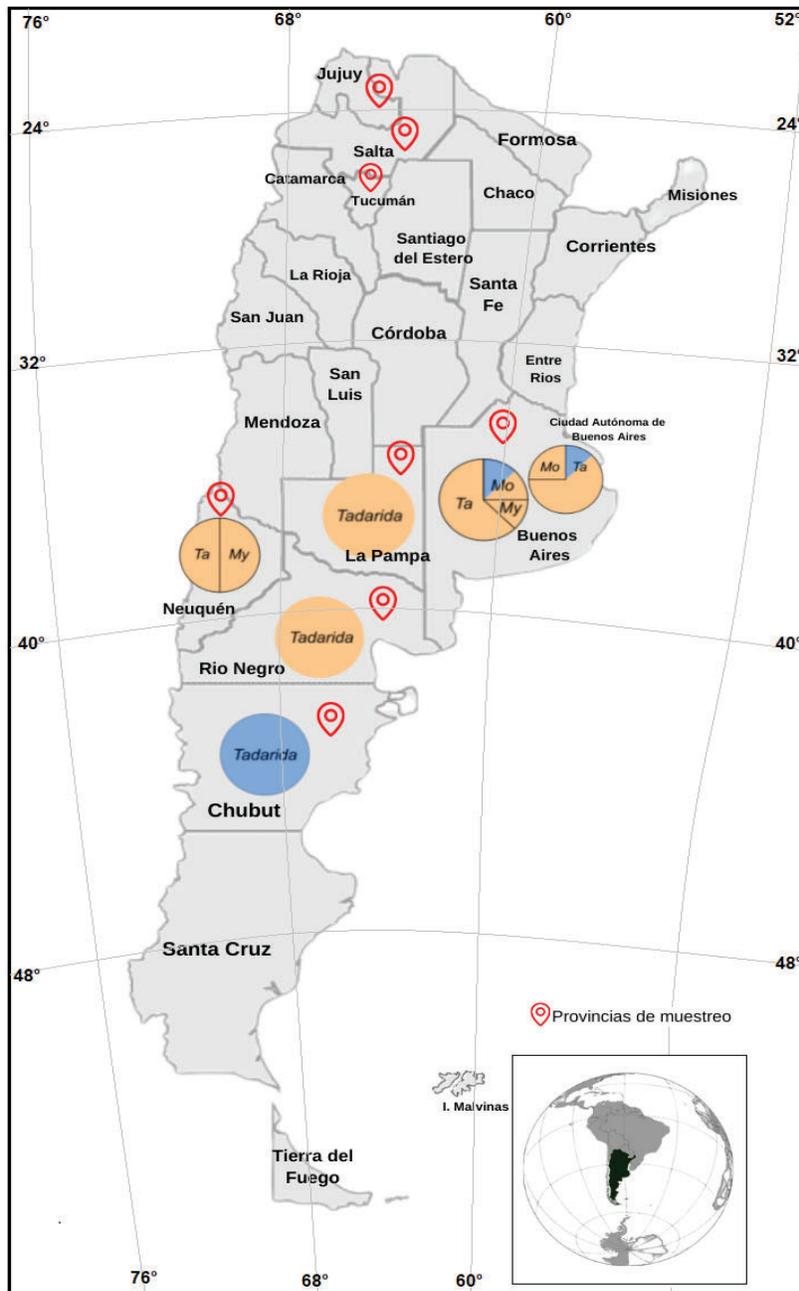


Figura 10. Mapa de la República Argentina donde se observan las provincias de muestreo. En los gráficos de torta, se muestran las especies que fueron positivas para CoV (Ta: *Tadarida brasiliensis*, Mo: *Molossus molossus*, My: *Myotis sp.*), en color azul se indica aquellos CoV pertenecientes al clado A y en color naranja los CoV pertenecientes al clado B.

6. DISCUSIÓN

La aparición reciente de los brotes de enfermedad respiratoria por los coronavirus SARS-CoV, en 2002 (Chan-Yeung & Xu, 2003; Chow et al., 2003; W. Li et al., 2005) y MERS-CoV, en 2012 (Chan et al., 2015; de Groot et al., 2013; *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)*, s. f.; Reusken et al., 2013) ha provocado un interés creciente en esta familia de virus, ya que afectaron a humanos y se identificaron como eventos zoonóticos, causados por murciélagos y camellos respectivamente.

En el 2020, el coronavirus SARS-CoV2 fue el causante de la pandemia que afectó a miles de personas en el mundo. Se ha sugerido que su reservorio podrían ser los murciélagos (Andersen et al., 2020b; Cui et al., 2019; Pagani et al., 2023). La perturbación de los ecosistemas naturales y semi-naturales, la explotación de la vida silvestre y la creciente conectividad global han aumentado los riesgos de la emergencia y propagación rápida de nuevas enfermedades infecciosas (Mohapatra & Menon 2022). Debido a esto, los CoV son un motivo de preocupación de futuros eventos zoonóticos que podrían afectar la salud pública. En la actualidad, existe el desafío de especificar los determinantes ecológicos y evolutivos de la emergencia viral (Caraballo et al., 2022) que nos permitan predecir los brotes de futuras zoonosis.

En el presente estudio hemos determinado que la prevalencia promedio de CoV en murciélagos insectívoros de Argentina es del 8.25%. En Argentina, Lucero Arteaga y cols, publicaron un prevalencia del 4% en una población de murciélagos hematófagos, insectívoros y frugívoros de la provincia de Jujuy y La Pampa (Lucero Arteaga et al., 2023). A nivel regional en países tales como, Brasil, Trinidad y Tobago, Costa Rica, Ecuador, Panamá y México, la prevalencia observada se encuentra alrededor al 7% (Bergner et al., 2021; Bittar et al., 2020; Carrington et al., 2008; Dominguez et al., 2007; Góes et al., 2013, 2016; Lima et al., 2013; Moreira-Soto et al., 2015; Osborne et al., 2011). En resumen la prevalencia de CoV puede considerarse que es baja y sus variaciones están influidas por las diferentes especies de murciélagos estudiadas y los factores ecológicos asociadas a las mismas.

En este trabajo de tesis se analizó un amplio rango de especies de murciélagos pertenecientes a una región importante del país, en la cual se detectó únicamente α -CoV tal como se ha descripto para toda la región de las Américas (Hernández-Aguilar et al., 2021).

Si bien las mayores epidemias de coronavirus fueron causadas por β -CoV, existen α -CoV humanos (229E y NL63) que han tenido gran diseminación entre la población, aunque con efectos leves en la salud (Cui et al., 2019). En consecuencia, es posible suponer que el potencial nocivo de los coronavirus circulantes en Argentina, en tanto son únicamente α -CoV, son de preocupación menor a los de otras regiones, por ejemplo, del sudeste asiático donde hay una alta prevalencia de β -CoV. No obstante, la vigilancia permanente es necesaria dado que existe una multiplicidad de linajes de α -CoV que podrían saltar a las personas e iniciar cadenas sostenidas de transmisión.

El análisis filogenético realizado en esta investigación reveló que los α -CoV hallados se distribuyen en dos clados no relacionados, denominados A y B (**Fig 7**). Estos resultados se complementan con la diversidad hallada en la provincia de Santa Fe, donde los investigadores generaron tres nuevos genomas completos de CoV (Tb1-Tb3), dos secuencias parciales en *T. brasiliensis*, y cuatro secuencias parciales adicionales en *M. molossus* (Cerri et al., 2023) y su análisis filogenético mostró que los nuevos CoV eran todos del género α -CoV. La variante Tb1 se agrupó en el clado A (**Figuras 7 y 8**), junto con otras secuencias de α -CoV identificadas en este trabajo en individuos de *T. brasiliensis*, mientras que las variantes Tb2 y Tb3 se agruparon en el clado B (**Figuras 7 y 9**), también estrechamente relacionadas con muestras de *T. brasiliensis* de este trabajo, lo que demuestra que estas variantes son mantenidas en simultáneo en distintas regiones del país. Además, en nuestra investigación es notable que tanto *Molossus* como *Tadarida* están representados por linajes presentes en ambos clados (**Fig 8 y 9**), por lo que se deduce que mantienen ambas variantes en simultaneidad. Sin embargo, es de destacar el hecho de que en el clado A las variantes de estas especies de molósidos no están directamente relacionadas, mientras que en el clado B el linaje de *Molossus* se desprende del de *Tadarida*. Este resultado se interpreta como un salto de hospedador, donde *Tadarida* es el hospedador donante, mientras que *Molossus* es el receptor. Este salto de hospedador es plausible dado que *Tadarida* y *Molossus* son taxones que comparten buena parte de su distribución geográfica, y también comparten el nicho ecológico, ya que ambos son géneros de murciélagos insectívoros sinantrópicos y son propensos a compartir refugios de especies mixtas (Bastiani et al., 2012; Voigt et al., 2015).

Esta asociación fue confirmada previamente mediante el análisis de la secuencia de CoV de muestras fecales de un refugio de maternidad donde cohabitan *Molossus molossus* y *Tadarida brasiliensis* en Brasil (Lima et al., 2013).

En esta investigación estudiamos la asociación entre la positividad de CoV en las distintas especies de murciélagos insectívoros de Argentina a través de la asignación de variables biológicas como el sexo, edad, peso y género. No se encontró asociación estadísticamente significativa para ninguna de las variables analizadas. Estos resultados son congruentes con investigaciones previas en las que se estudió la influencia de estos factores en la infectividad de CoV en distintas especies de murciélagos y regiones geográficas. Por ejemplo, en Tailandia se estudió la positividad de CoV en murciélagos de la especie *Pteropus lylei* y los factores como edad, ubicación, sexo o estación del año y los resultados concluyeron que la infectividad no se correlacionaba con ninguno de estos factores, salvo con la presencia de especímenes juveniles (edad), coincidiendo con estudios de Alemania (Gloza-Rausch et al., 2008), Ghana (Meyer et al., 2024) y EEUU (Osborne et al., 2011). Estos estudios refuerzan la hipótesis de que los juveniles al ser más susceptibles a la infección por CoV actúan como propagadores manteniendo el virus dentro de las colonias (Wacharapluesadee et al., 2018). Si bien en el presente trabajo de tesis no se encontró relación entre la positividad y la edad de los murciélagos, esto puede deberse a que el número de juveniles estudiado fue relativamente bajo (122 juveniles de un total de 594 murciélagos estudiados), ya que la estrategia de muestreo no implicó capturar juveniles en las colonias (menos aún lactantes), y estos menos propensos a hallarse en el exterior, y por lo tanto a ser remitidos a los centros de zoonosis.

Por otro lado, en el análisis estadístico descriptivo de frecuencias relativas, no pudimos encontrar asociación entre la positividad para CoV y la estación del año, ya que como se observa en el **figura 6B** la tasa de positividad exhibe un comportamiento errático, debido a que el muestreo no es homogéneo entre los distintos meses del año, contiene un sesgo, además de no cumplir con el tamaño muestral necesario para dicho análisis. A pesar de que en el análisis estadístico descriptivo de frecuencias absolutas (**Fig. 6A**) se observa un aumento de casos positivos hacia los meses entre febrero y abril, alcanzando el pico máximo en marzo, esto se debe a que durante esos meses hubo una mayor cantidad de especímenes estudiados, y no a un aumento en la tasa de positividad. Esto es coherente con la temporada de los meses cálidos (verano/otoño) en el hemisferio sur, donde en esta época la población es

más numerosa y existe un mayor contacto con el hombre, los machos están más activos sexualmente y las hembras están preñadas o con crías (Bastiani et al., 2012).

Aunque esta investigación hace una contribución relevante al conocimiento de los CoV en Argentina, y en el contexto de la diversidad de CoV conocida, es importante tener en consideración las limitaciones metodológicas de esta aproximación. Por un lado, el hecho de tener un muestreo incompleto de las regiones geográficas y de la diversidad de potenciales hospedadores, hace que no podamos descartar la circulación de otros CoV (ej: β -CoV) en el país. Por otra parte, las muestras provienen de un muestreo por conveniencia (muestras remitidas para diagnóstico de rabia) en lugar de un muestreo aleatorio a campo. Esto produce dos sesgos. El primero es un sesgo hacia especímenes enfermos o alterados por su modo de captura, que indirectamente influyen en el resultado final de detección. El segundo sesgo tiene que ver con que es más probable que se remitan animales de especies sinantrópicas. Estos factores derivados de la estrategia de muestreo inciden sobre la estimación precisa de la prevalencia, y podrían diferir de un cálculo sobre un muestreo al azar tomado en poblaciones naturales. Es posible que entre las variables ecológicas y biológicas analizadas, también se haya producido un sesgo, dado que hay factores que afectan la prevalencia de los CoV y que no han podido ser medidos por no tratarse de poblaciones naturales, tales como el tamaño de la colonia, la densidad poblacional y la composición de la colonia. Además, en el caso de las variables ecológicas solo se pudo realizar un análisis gráfico-descriptivo dado a que no contamos con la cantidad necesaria de muestras positivas.

También, las secuencias con las que realizamos el análisis filogenético, son secuencias parciales de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), lo que afecta la resolución filogenética y puede enmascarar procesos como la recombinación. A pesar de esto, esta metodología ha dado buenos resultados a la hora de detectar presencia, diversidad y relaciones filogenéticas de los CoV circulantes en todo el mundo (Watanabe et al., 2010), pero también sabemos que no reflejan la historia evolutiva completa y tampoco permite el estudio de recombinación de estos virus (Cerri et al., 2023).

CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis realizamos la detección y caracterización molecular de los coronavirus en murciélagos insectívoros de Argentina, durante el periodo 2019-2021. Se realizó una estimación de la prevalencia que hasta el momento no se había reportado arrojando un valor de 8,25%, y se estudió su diversidad concluyendo que todos los virus circulantes detectados fueron α -CoV distribuidos en dos clados, A y B. Finalmente, se estudió la relación de positividad entre los coronavirus y las variables biológicas y ecológicas de cada espécimen, resultando que no hubo asociación estadísticamente significativa entre ellas, pero no obstante se encontró un pico en los meses cálidos, que coincide con una mayor frecuencia de individuos activos entre las poblaciones.

Esta investigación hace un aporte relevante para el conocimiento de la diversidad y de epidemiología de los coronavirus en el país y en la región. A futuro, podría ser complementada aumentando el rango de hospedadores y regiones estudiadas, así como ampliando el foco del análisis, por ejemplo, desde una perspectiva genómica.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, R. S., do Canto Olegário, J., Weber, M. N., da Silva, M. S., Canova, R., Sauthier, J. T., Baumbach, L. F., Witt, A. A., Varela, A. P. M., Mayer, F. Q., da Fontoura Budaszewski, R., & Canal, C. W. (2021). Detection of coronavirus in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in southern Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 10.1111/tbed.14150. <https://doi.org/10.1111/tbed.14150>
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020a). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450-452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020b). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Anthony, S. J., Johnson, C. K., Greig, D. J., Kramer, S., Che, X., Wells, H., Hicks, A. L., Joly, D. O., Wolfe, N. D., Daszak, P., Karesh, W., Lipkin, W. I., Morse, S. S., Mazet, J. A. K., & Goldstein, T. (2017a). Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution*, 3(1), vex012. <https://doi.org/10.1093/ve/vex012>
- Anthony, S. J., Johnson, C. K., Greig, D. J., Kramer, S., Che, X., Wells, H., Hicks, A. L., Joly, D. O., Wolfe, N. D., Daszak, P., Karesh, W., Lipkin, W. I., Morse, S. S., Mazet, J. A. K., & Goldstein, T. (2017b). Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution*, 3(1), vex012. <https://doi.org/10.1093/ve/vex012>
- Arnaut, Y., Picard-Meyer, E., Robardet, E., Cappelle, J., Cliquet, F., Touzalin, F., Jimenez, G., & Djelouadji, Z. (2023). Assessment of virus and *Leptospira* carriage in bats in France. *PLOS ONE*, 18(10), e0292840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292840>

ASM Mammal Diversity Database. (2019).

[https://www.mammaldiversity.org/#Y2hpcm9wdGVyYSZnbG9iYWxfc2VhcmNoPX
RydWUmbG9vc2U9dHJ1ZQ](https://www.mammaldiversity.org/#Y2hpcm9wdGVyYSZnbG9iYWxfc2VhcmNoPX
RydWUmbG9vc2U9dHJ1ZQ)

Baker, M. L., Schountz, T., & Wang, L.-F. (2013). Antiviral immune responses of bats: A review. *Zoonoses and Public Health*, *60*(1), 104-116.

<https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x>

Baldwin, H. J. (2022). *Epidemiology and ecology of virus and host: Bats and coronaviruses in Ghana, West Africa* [Thesis, Macquarie University].

<https://doi.org/10.25949/19432703.v1>

Banerjee, A., Kulcsar, K., Misra, V., Frieman, M., & Mossman, K. (2019). Bats and Coronaviruses. *Viruses*, *11*(1), 41. <https://doi.org/10.3390/v11010041>

Barquez, R. M., & Díaz, M. M. . (2020). *NUEVA GUÍA DE LOS MURCIÉLAGOS DE ARGENTINA* (Publicación Especial N° 3-PCMA).

Bastiani, C. E., Ramírez, N. N., Alegre, E. A., & Ruiz, R. M. (2012). Identification and characterization of bats shelters in corrientes city, argentina. *Revista Veterinaria*, *23*, 104-109.

Bergner, L. M., Mollentze, N., Orton, R. J., Tello, C., Broos, A., Biek, R., & Streicker, D. G. (2021). Characterizing and Evaluating the Zoonotic Potential of Novel Viruses Discovered in Vampire Bats. *Viruses*, *13*(2), 252. <https://doi.org/10.3390/v13020252>

Bittar, C., Machado, R. R. G., Comelis, M. T., Bueno, L. M., Beguelini, M. R., Morielle-Versute, E., Nogueira, M. L., & Rahal, P. (2020). Alphacoronavirus Detection in Lungs, Liver, and Intestines of Bats from Brazil. *Microbial Ecology*, *79*(1), 203-212. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01391-x>

Bolatti, E. M., Zorec, T. M., Montani, M. E., Hošnjak, L., Chouhy, D., Viarengo, G., Casal, P. E., Barquez, R. M., Poljak, M., & Giri, A. A. (2020). A Preliminary Study of the

- Virome of the South American Free-Tailed Bats (*Tadarida brasiliensis*) and Identification of Two Novel Mammalian Viruses. *Viruses*, 12(4), 422.
<https://doi.org/10.3390/v12040422>
- Bueno, L. M., Rizotto, L. S., Viana, A. de O., Silva, L. M. N., de Moraes, M. V. D. S., Benassi, J. C., Scagion, G. P., Dorlass, E. G., Lopes, B. L. T., Cunha, I. N., Melinski, R., de Alvarenga, I. F., Leitão, G. L., Rodrigues, R. C., Pereira, I. M. da S., Dos Santos, L. D. N., Fisch, F., Rocha, A. D., Port, D., ... Durigon, E. L. (2022). High genetic diversity of alphacoronaviruses in bat species (Mammalia: Chiroptera) from the Atlantic Forest in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), e2863-e2875. <https://doi.org/10.1111/tbed.14636>
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 531-545. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
- Canale, C. (2011). *Energetic costs of the immune response and torpor use in a primate*.
- Caraballo, D. A. (2022). Cross-Species Transmission of Bat Coronaviruses in the Americas: Contrasting Patterns between Alphacoronavirus and Betacoronavirus. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e0141122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01411-22>
- Caraballo, D. A., Sabio, M. S., Colombo, V. C., Piccirilli, M. G., Vico, L., Hirmas Riade, S. M., Campos, J., Martínez, G., Beltrán, F., Baumeister, E., & Cisterna, D. M. (2022). The Role of Molossidae and Vespertilionidae in Shaping the Diversity of Alphacoronaviruses in the Americas. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e0314322. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03143-22>
- Carrington, C. V. F., Foster, J. E., Zhu, H. C., Zhang, J. X., Smith, G. J. D., Thompson, N., Auguste, A. J., Ramkissoon, V., Adesiyun, A. A., & Guan, Y. (2008). Detection and phylogenetic analysis of group 1 coronaviruses in South American bats. *Emerging*

- Infectious Diseases*, 14(12), 1890-1893. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080642>
- Cerri, A., Bolatti, E. M., Zorec, T. M., Montani, M. E., Rimondi, A., Hosnjak, L., Casal, P. E., Di Domenica, V., Barquez, R. M., Poljak, M., & Giri, A. A. (2023). Identification and characterization of novel alphacoronaviruses in *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera, Molossidae) from Argentina: Insights into recombination as a mechanism favoring bat coronavirus cross-species transmission. *Microbiology Spectrum*, 11(5), e02047-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02047-23>
- Chan, J. F. W., Lau, S. K. P., To, K. K. W., Cheng, V. C. C., Woo, P. C. Y., & Yuen, K.-Y. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 465-522. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-14>
- Chan-Yeung, M., & Xu, R.-H. (2003). SARS: Epidemiology. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 8 Suppl(Suppl 1), S9-14. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x>
- Chege, H. (2015). *Documenting the bat species assemblages of the Meletse Bat Research and Conservation Training Centre in Limpopo Province, Thabazimbi, South Africa*. *South Africa. African Bat Conserv. News*, 38, 5-8.
- Chen, L., Liu, B., Yang, J., & Jin, Q. (2014). DBatVir: The database of bat-associated viruses. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2014, bau021. <https://doi.org/10.1093/database/bau021>
- Chow, K. Y. C., Hon, C. C., Hui, R. K. H., Wong, R. T. Y., Yip, C. W., Zeng, F., & Leung, F. C. C. (2003). Molecular advances in severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 1(4), 247-262. [https://doi.org/10.1016/s1672-0229\(03\)01031-3](https://doi.org/10.1016/s1672-0229(03)01031-3)
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. (s. f.). Recuperado 14 de septiembre de 2023, de <https://ictv.global/taxonomy>

de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R. A. M., Galiano, M., Gorbalenya, A. E., Memish, Z. A., Perlman, S., Poon, L. L. M., Snijder, E. J., Stephens, G. M., Woo, P. C. Y., Zaki, A. M., Zambon, M., & Ziebuhr, J. (2013). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, *87*(14), 7790-7792. <https://doi.org/10.1128/JVI.01244-13>

Decaro, N., & Lorusso, A. (2020). Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, *244*, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693>

Díaz, M. M., Solari, S., Gregorin, R., Aguirre, L. F., & Barquez, R. M. (2021). *Clave de Identificación de los murciélagos Neotropicales*. Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/156765>

Dolja, V. V., & Koonin, E. V. (2018). Metagenomics reshapes the concepts of RNA virus evolution by revealing extensive horizontal virus transfer. *Virus Research*, *244*, 36-52. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.020>

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

Drexler, J. F., Corman, V. M., & Drosten, C. (2014). Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Research*, *101*, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.013>

Falcón, A., Vázquez-Morón, S., Casas, I., Aznar, C., Ruiz, G., Pozo, F., Perez-Breña, P., Juste, J., Ibáñez, C., Garin, I., Aihartza, J., & Echevarría, J. E. (2011). Detection of

- alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Archives of Virology*, 156(10), 1883-1890. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1057-1>
- Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z.-L., & Zhou, P. (2019). Bat Coronaviruses in China. *Viruses*, 11(3), 210. <https://doi.org/10.3390/v11030210>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015a). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses*, 1282, 1-23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015b). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses*, 1282, 1-23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Göttsche, M., Panning, M., Drexler, J. F., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., Müller, M., Pfefferle, S., & Drosten, C. (2008). Detection and Prevalence Patterns of Group I Coronaviruses in Bats, Northern Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 14(4), 626-631. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>
- Góes, L. G. B., Campos, A. C. de A., Carvalho, C. de, Ambar, G., Queiroz, L. H., Cruz-Neto, A. P., Munir, M., & Durigon, E. L. (2016). Genetic diversity of bats coronaviruses in the Atlantic Forest hotspot biome, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 510-513. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.034>
- Góes, L. G. B., Ruvalcaba, S. G., Campos, A. A., Queiroz, L. H., de Carvalho, C., Jerez, J. A., Durigon, E. L., Dávalos, L. I. I., & Dominguez, S. R. (2013). Novel Bat Coronaviruses, Brazil and Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), 1711-1713. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130525>
- Graham, R. L., & Baric, R. S. (2010). Recombination, reservoirs, and the modular spike: Mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *Journal of Virology*, 84(7),

3134-3146. <https://doi.org/10.1128/JVI.01394-09>

- Graham, R. L., Sparks, J. S., Eckerle, L. D., Sims, A. C., & Denison, M. R. (2008). SARS coronavirus replicase proteins in pathogenesis. *Virus Research*, *133*(1), 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.017>
- Hernández-Aguilar, I., Lorenzo, C., Santos-Moreno, A., Naranjo, E. J., & Navarrete-Gutiérrez, D. (2021). Coronaviruses in Bats: A Review for the Americas. *Viruses*, *13*(7), 1226. <https://doi.org/10.3390/v13071226>
- Huong, N. Q., Nga, N. T. T., Long, N. V., Luu, B. D., Latinne, A., Pruvot, M., Phuong, N. T., Quang, L. T. V., Hung, V. V., Lan, N. T., Hoa, N. T., Minh, P. Q., Diep, N. T., Tung, N., Ky, V. D., Robertson, S. I., Thuy, H. B., Long, N. V., Gilbert, M., ... Olson, S. H. (2020). Coronavirus testing indicates transmission risk increases along wildlife supply chains for human consumption in Viet Nam, 2013-2014. *PloS One*, *15*(8), e0237129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237129>
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (Eds.). (2011). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. En *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.
- Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y. I., Yutin, N., Zerbini, F. M., & Kuhn, J. H. (2020). Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *84*(2), e00061-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00061-19>
- Lau, S. K. P., Fan, R. Y. Y., Luk, H. K. H., Zhu, L., Fung, J., Li, K. S. M., Wong, E. Y. M., Ahmed, S. S., Chan, J. F. W., Kok, R. K. H., Chan, K.-H., Wernery, U., Yuen, K.-Y., & Woo, P. C. Y. (2018). Replication of MERS and SARS coronaviruses in bat cells offers insights to their ancestral origins. *Emerging Microbes & Infections*, *7*(1), 209.

<https://doi.org/10.1038/s41426-018-0208-9>

Lau, Y. L., & Peiris, J. S. M. (2005). Pathogenesis of severe acute respiratory syndrome.

Current Opinion in Immunology, 17(4), 404-410.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.05.009>

Letko, M., Seifert, S. N., Olival, K. J., Plowright, R. K., & Munster, V. J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(8),

461-471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>

Li, C., Yang, Y., & Ren, L. (2020). Genetic evolution analysis of 2019 novel coronavirus and coronavirus from other species. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of*

Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 82,

104285. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104285>

Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z.,

Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., &

Wang, L.-F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*

(*New York, N.Y.*), 310(5748), 676-679. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>

Lima, F. E. de S., Campos, F. S., Kunert Filho, H. C., Batista, H. B. de C. R., Carnielli, P.,

Cibulski, S. P., Spilki, F. R., Roehe, P. M., & Franco, A. C. (2013). Detection of

Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian

free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. *Virus*

Genes, 47(1), 164-167. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0899-x>

Lucero Arteaga, F., Miragaya, M., Molina, N., Mondino, M., Bracamonte, C., Capitelli, G.,

Mundo, S., Torres, C., & Bratanich, A. (2023). Identification of coronaviruses in bats and rodents in northern and central Argentina. *Archives of Virology*, 168(3), 78.

<https://doi.org/10.1007/s00705-023-05703-y>

Meyer, M., Melville, D. W., Baldwin, H. J., Wilhelm, K., Nkrumah, E. E., Badu, E. K.,

Oppong, S. K., Schwensow, N., Stow, A., Vallo, P., Corman, V. M., Tschapka, M., Drosten, C., & Sommer, S. (2024). Bat species assemblage predicts coronavirus prevalence. *Nature Communications*, *15*, 2887.

<https://doi.org/10.1038/s41467-024-46979-1>

Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). (s. f.). Recuperado 21 de julio de 2021, de

<https://www.who.int/westernpacific/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers>

Miller, M. A., Schwartz, T., Pickett, B. E., He, S., Klem, E. B., Scheuermann, R. H., Passarotti, M., Kaufman, S., & O'Leary, M. A. (2015). A RESTful API for Access to Phylogenetic Tools via the CIPRES Science Gateway. *Evolutionary Bioinformatics Online*, *11*, 43-48. <https://doi.org/10.4137/EBO.S21501>

Moreira-Soto, A., Taylor-Castillo, L., Vargas-Vargas, N., Rodríguez-Herrera, B., Jiménez, C., & Corrales-Aguilar, E. (2015). Neotropical Bats from Costa Rica harbour Diverse Coronaviruses. *Zoonoses and Public Health*, *62*(7), 501-505.

<https://doi.org/10.1111/zph.12181>

Morse, J. S., Lalonde, T., Xu, S., & Liu, W. R. (2020). Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. *Chembiochem*, *21*(5), 730-738.

<https://doi.org/10.1002/cbic.202000047>

Muradrasoli, S., Mohamed, N., Hornyák, A., Fohlman, J., Olsen, B., Belák, S., & Blomberg, J. (2009). Broadly targeted multiprobe QPCR for detection of coronaviruses: Coronavirus is common among mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Virological Methods*, *159*(2), 277-287. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.022>

Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M.,

- Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, Md. I. (2020a). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
- Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, Md. I. (2020b). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
- Nylander, J. (2004). *Mr Modeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre.*
- Olival, K. J., Hosseini, P. R., Zambrana-Torrel, C., Ross, N., Bogich, T. L., & Daszak, P. (2017). Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*, 546(7660), 646-650. <https://doi.org/10.1038/nature22975>
- Osborne, C., Cryan, P. M., O'Shea, T. J., Oko, L. M., Ndaluka, C., Calisher, C. H., Berglund, A. D., Klavetter, M. L., Bowen, R. A., Holmes, K. V., & Dominguez, S. R. (2011). Alphacoronaviruses in New World Bats: Prevalence, Persistence, Phylogeny, and Potential for Interaction with Humans. *PLoS ONE*, 6(5), e19156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019156>
- O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Hayman, D. T. S., Luis, A. D., Peel, A. J., Plowright, R. K., & Wood, J. L. N. (2014). Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 741-745. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>
- Pagani, I., Ghezzi, S., Alberti, S., Poli, G., & Vicenzi, E. (2023). Origin and evolution of SARS-CoV-2. *European Physical Journal plus*, 138(2), 157.

<https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-03719-6>

Reusken, C. B. E. M., Haagmans, B. L., Müller, M. A., Gutierrez, C., Godeke, G.-J., Meyer, B., Muth, D., Raj, V. S., Smits-De Vries, L., Corman, V. M., Drexler, J.-F., Smits, S. L., El Tahir, Y. E., De Sousa, R., van Beek, J., Nowotny, N., van Maanen, K., Hidalgo-Hermoso, E., Bosch, B.-J., ... Koopmans, M. P. G. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: A comparative serological study. *The Lancet. Infectious Diseases*, *13*(10), 859-866. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70164-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70164-6)

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Ruiz-Aravena, M., McKee, C., Gamble, A., Lunn, T., Morris, A., Snedden, C. E., Yinda, C. K., Port, J. R., Buchholz, D. W., Yeo, Y. Y., Faust, C., Jax, E., Dee, L., Jones, D. N., Kessler, M. K., Falvo, C., Crowley, D., Bharti, N., Brook, C. E., ... Plowright, R. K. (2022a). Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nature Reviews. Microbiology*, *20*(5), 299-314. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>

Ruiz-Aravena, M., McKee, C., Gamble, A., Lunn, T., Morris, A., Snedden, C. E., Yinda, C. K., Port, J. R., Buchholz, D. W., Yeo, Y. Y., Faust, C., Jax, E., Dee, L., Jones, D. N., Kessler, M. K., Falvo, C., Crowley, D., Bharti, N., Brook, C. E., ... Plowright, R. K. (2022b). Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nature Reviews. Microbiology*, *20*(5), 299-314. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

- Shamsi, A., Mohammad, T., Anwar, S., AlAjmi, M. F., Hussain, A., Rehman, Md. T., Islam, A., & Hassan, Md. I. (2020). Glecaprevir and Maraviroc are high-affinity inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: Possible implication in COVID-19 therapy. *Bioscience Reports*, 40(6), BSR20201256. <https://doi.org/10.1042/BSR20201256>
- Shivaprakash, K. N., Sen, S., Paul, S., Kiesecker, J. M., & Bawa, K. S. (2021). Mammals, wildlife trade, and the next global pandemic. *Current Biology: CB*, 31(16), 3671-3677.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.006>
- Siddell, S. G., Anderson, R., Cavanagh, D., Fujiwara, K., Klenk, H. D., Macnaughton, M. R., Pensaert, M., Stohlman, S. A., Sturman, L., & van der Zeijst, B. A. M. (1983). Coronaviridae. *Intervirology*, 20(4), 181-189. <https://doi.org/10.1159/000149390>
- Skirmuntt, E. C., Escalera-Zamudio, M., Teeling, E. C., Smith, A., & Katzourakis, A. (2020). The Potential Role of Endogenous Viral Elements in the Evolution of Bats as Reservoirs for Zoonotic Viruses. *Annual Review of Virology*, 7(1), 103-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015613>
- 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>
- Taxon Details | ICTV*. (s. f.). Recuperado 8 de noviembre de 2023, de https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202201847&taxon_name=Orthocoronavirinae
- Ton, A., Gentile, F., Hsing, M., Ban, F., & Cherkasov, A. (2020). Rapid Identification of Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease by Deep Docking of 1.3 Billion Compounds. *Molecular Informatics*, 39(8), 2000028. <https://doi.org/10.1002/minf.202000028>

- Umakanthan, S., Sahu, P., Ranade, A. V., Bukelo, M. M., Rao, J. S., Abrahao-Machado, L. F., Dahal, S., Kumar, H., & Kv, D. (2020). Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal*, 96(1142), 753-758. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138234>
- Voigt, C. C., Phelps, K. L., Aguirre, L. F., Corrie Schoeman, M., Vanitharani, J., & Zubaid, A. (2015). Bats and Buildings: The Conservation of Synanthropic Bats. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*, 427-462. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_14
- Wacharapluesadee, S., Duengkae, P., Chaiyes, A., Kaewpom, T., Rodpan, A., Yingsakmongkon, S., Petcharat, S., Phengsakul, P., Maneeorn, P., & Hemachudha, T. (2018). Longitudinal study of age-specific pattern of coronavirus infection in Lyle's flying fox (*Pteropus lylei*) in Thailand. *Virology Journal*, 15, 38. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0950-6>
- Wang, L.-F., Walker, P. J., & Poon, L. L. M. (2011). Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: Are bats «special» as reservoirs for emerging viruses? *Current Opinion in Virology*, 1(6), 649-657. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>
- Watanabe, S., Masangkay, J. S., Nagata, N., Morikawa, S., Mizutani, T., Fukushi, S., Alviola, P., Omatsu, T., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Fujii, H., Tsuda, S., Endoh, M., Kato, K., Tohya, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., & Akashi, H. (2010). Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases*, 16(8), 1217-1223. <https://doi.org/10.3201/eid1608.100208>
- Wolf, Y. I., Kazlauskas, D., Iranzo, J., Lucía-Sanz, A., Kuhn, J. H., Krupovic, M., Dolja, V. V., & Koonin, E. V. (2018). Origins and Evolution of the Global RNA Virome. *mBio*, 9(6), e02329-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02329-18>

- Wong, A. C. P., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2021). Interspecies Jumping of Bat Coronaviruses. *Viruses*, *13*(11), 2188. <https://doi.org/10.3390/v13112188>
- Wong, A. C. P., Li, X., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2019). Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses*, *11*(2), 174. <https://doi.org/10.3390/v11020174>
- Woo, P. C. Y., de Groot, R. J., Haagmans, B., Lau, S. K. P., Neuman, B. W., Perlman, S., Sola, I., van der Hoek, L., Wong, A. C. P., & Yeh, S.-H. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. *The Journal of General Virology*, *104*(4). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001843>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y., & Yuen, K.-Y. (2009a). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *234*(10), 1117-1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y., & Yuen, K.-Y. (2009b). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *234*(10), 1117-1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*, *86*(7), 3995-4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Li, K. S. M., Poon, R. W. S., Wong, B. H. L., Tsoi, H., Yip, B. C. K., Huang, Y., Chan, K., & Yuen, K. (2006). Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*, *351*(1), 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.041>
- Xiao, X., Newman, C., Buesching, C. D., Macdonald, D. W., & Zhou, Z.-M. (2021). Animal

- sales from Wuhan wet markets immediately prior to the COVID-19 pandemic. *Scientific Reports*, 11(1), 11898. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91470-2>
- Zapatero Gaviria, A., & Barba Martin, R. (2023). [What do we know about the origin of COVID-19 three years later?]. *Revista Clinica Espanola*, 223(4), 240-243. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2023.02.002>
- Zhou, H., Ji, J., Chen, X., Bi, Y., Li, J., Wang, Q., Hu, T., Song, H., Zhao, R., Chen, Y., Cui, M., Zhang, Y., Hughes, A. C., Holmes, E. C., & Shi, W. (2021). Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell*, 184(17), 4380-4391.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.008>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zmasek, C. M., Lefkowitz, E. J., Niewiadomska, A., & Scheuermann, R. H. (2022a). Genomic evolution of the Coronaviridae family. *Virology*, 570, 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.03.005>
- Zmasek, C. M., Lefkowitz, E. J., Niewiadomska, A., & Scheuermann, R. H. (2022b). Genomic evolution of the Coronaviridae family. *Virology*, 570, 123-133.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.03.005>

9. ANEXOS

ANEXO 1. Tabla con datos de ID de muestra, año y fecha de recolección, provincia, localidad, género, especie, sexo, edad y peso de cada espécimen positivo para CoV. M (masculino), F (femenino), juv (juvenil), ad (adulto). ND (no disponible).

ID	Año	Fecha	Provincia	Localidad	Género	Especie	Sexo	Edad	Peso
A379	2020	21.02.20 20	Buenos Aires	Balcarce	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	juv	7.84
A817	2020	ND	Buenos Aires	Ex. de la Cruz	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	F	juv	14.32
A929	2020	24.07.20 20	Buenos Aires	Chivilcoy	<i>Dasypterus</i>	<i>ega</i>	M	juv	9.86
P111 -21	2021	ND	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	juv	6.53
P125	2020	ND	ND	ND	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	juv	5.63
P176	2020	27.01.20 20	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	juv	9.67
P205	2020	31.01.20 20	CABA	CABA	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	F	juv	7.99
A394	2020	26.02.20 20	Buenos Aires	Escobar	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	M	ad	9.41
A404	2020	ND	Buenos Aires	Loma de Zamora	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	F	ad	13.38

A415	2020	ND	Buenos Aires	Merlo	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	8.15
A436	2020	ND	Buenos Aires	Olavarría	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	9.21
A479	2020	06.03.20 20	Buenos Aires	San Isidro	<i>Myotis</i>	<i>sp.</i>	M	ad	6.00
A488	2020	06.03.20 20	Buenos Aires	Berazategui	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	M	ad	17.00
A499	2020	06.03.20 20	Buenos Aires	San Fernando	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	10.00
A500	2020	06.03.20 20	Buenos Aires	Gral Pueyrredon	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	10.50
A533	2020	11.03.20 20	Buenos Aires	Morón	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	10.50
A541	2020	11.03.20 20	Buenos Aires	La Plata	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	F	ad	17.00
A545	2020	12.03.20 20	Buenos Aires	Ezeiza	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	F	ad	15.00
A553	2020	13.03.20 20	Buenos Aires	Luján	<i>Eumops</i>	<i>sp.</i>	F	ad	14.50
A563	2020	13.03.20 20	Buenos Aires	Gral Pueyrredon	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	9.50
A594	2020	18.03.20 20	Buenos Aires	Avellaneda	<i>Eumops</i>	<i>bonaerensis</i>	F	ad	17.31
A604	2020	12.03.20 20	Buenos Aires	Tigre	<i>Myotis</i>	<i>sp.</i>	M	ad	7.00

A620	2020	30.03.20 20	Buenos Aires	Gral Rodriguez	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	M	ad	19.50
A637 b	2020	ND	Buenos Aires	San Martin	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	13.50
A641	2020	08.04.20 20	Buenos Aires	San pedro	<i>Dasypterus</i>	<i>ega</i>	M	ad	12.00
A654	2020	06.04.20 20	Buenos Aires	Morón	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	12.50
A854	2020	ND	Buenos Aires	Saladillo	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	13.23
P104 -21	2021	02.02.20 21	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	10.00
P113 -21	2021	05.02.20 21	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	13.2
P164	2020	27.01.20 20	CABA	CABA	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	F	ad	6.98
P166	2020	27.01.20 20	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	8.58
P196	2020	29.01.20 20	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	9.01
P197	2020	ND	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	9.07
P207	2020	31.01.20 20	Neuquén	Neuquén	<i>Myotis</i>	<i>sp.</i>	M	ad	3.73
P364 -21	2021	15.04.20 21	Chubut	Trelew	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	8.12

P507	2020	07.04.20 20	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	12.35
P534	2020	21.04.20 20	Buenos Aires	Moreno	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	M	ad	14.88
P226	2020	ND	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	8.85
P552	2020	04.05.20 20	La Pampa	Santa Rosa	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	6.75
P919	2020	11.12.20 20	Neuquén	Neuquén	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	6.00
P472	2020	ND	ND	ND	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	13.63
P934	2020	18.12.20 20	Río Negro	Las Grutas	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	12.96
A637	2020	27.01.20 20	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	7.41
P108 -19	2019	ND	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	F	ad	11.50
P559	2020	06.05.20 20	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	13.57
P755	2020	30.09.20 20	Río Negro	Viedma	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	9.30
P756	2020	30.09.20 20	Río Negro	San Antonio Oeste	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	10.00
P778	2020	13.10.20 20	Río Negro	Viedma	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	11.06

P176 -21	2021	ND	CABA	CABA	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	M	ad	8.50
-------------	------	----	------	------	-----------------	---------------------	---	----	------

ANEXO 2. Tabla de secuencias detectadas en este estudio con su número de acceso, publicadas en la base de datos Genbank.

Nº	Número de acceso	Nombre de secuencias
1	OP169150	Alphacoronavirus sp. isolate A379 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
2	OP169151	Alphacoronavirus sp. isolate A415 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
3	OP169152	Alphacoronavirus sp. isolate A479 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
4	OP169153	Alphacoronavirus sp. isolate A488 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
5	OP169154	Alphacoronavirus sp. isolate A533 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
6	OP169155	Alphacoronavirus sp. isolate A637 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
7	OP169156	Alphacoronavirus sp. isolate P111_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
8	OP169157	Alphacoronavirus sp. isolate P113_21 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
9	OP169158	Alphacoronavirus sp. isolate P125 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
10	OP169159	Alphacoronavirus sp. isolate P164_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
11	OP169160	Alphacoronavirus sp. isolate P176_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
12	OP169161	Alphacoronavirus sp. isolate P196_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
13	OP169162	Alphacoronavirus sp. isolate P197_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
14	OP169163	Alphacoronavirus sp. isolate P205_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
15	OP169164	Alphacoronavirus sp. isolate P207_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
16	OP169165	Alphacoronavirus sp. isolate P364_21 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
17	OP169166	Alphacoronavirus sp. isolate P507 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab)

		gene, partial cds
18	OP169167	Alphacoronavirus sp. isolate P534 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
19	OP169168	Alphacoronavirus sp. isolate P552_20 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
20	OP169169	Alphacoronavirus sp. isolate P919 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds
21	OP169170	Alphacoronavirus sp. isolate P934 RNA dependent RNA polymerase (ORF1ab) gene, partial cds