

Informe final publicable de proyecto

Caracterización de virus en murciélagos del Uruguay. Implicancias para la conservación de la biodiversidad e impacto en la salud humana y animal.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155570

06/09/2023

DELFRARO VÁZQUEZ, Adriana (Responsable Técnico - Científico)

FRBASILE GIURATO, Sandra (Co-Responsable Técnico-Científico)

BOTTO NUÑEZ, Germán (Investigador)

DÍAZ SUAREZ, Juan Manuel (Investigador)

MOREIRA MARRERO, Lucia (Investigador)

REGO DO MATO, Natalia (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA \\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Las zoonosis virales emergentes son causa de enfermedades severas en la población humana y constituyen un desafío para la salud, la vida silvestre y la pecuaria, en las que pueden causar grandes pérdidas. Los murciélagos, por su amplia distribución, características y hábitos de vida pueden favorecer la adquisición y dispersión de virus. Se los ha reconocido como reservorio del rhabdovirus, coronavirus y filovirus y se les ha involucrado en el ciclo biológico de varios arbovirus. El objetivo de este proyecto fue avanzar en el conocimiento de las poblaciones virales en murciélagos del Uruguay, enfocándonos en virus emergentes y avanzar en la utilización de la diversidad de virus prevalentes como los herpesvirus (Hv), como indicadores de movimientos poblacionales de los murciélagos.

Identificamos por primera vez la presencia de Alfacoronavirus en murciélagos del Uruguay, en un ejemplar de *Molossus molossus*. Avanzamos en el conocimiento de los alfavirus encefalíticos, en particular los virus Río Negro (RNV) y encefalitis equina del este (EEEV). RNV se detectó en murciélagos de 7 especies insectívoras y una hematófaga, mostrando una amplia distribución en el territorio nacional. El virus EEEV, con una distribución más restringida está presente en dos especies insectívoras. Se identificó RNV en una nueva especie de mosquito.

Se observó una alta prevalencia y amplia distribución geográfica de gamma y betaherpesvirus, algunos identificados en nuevas especies de murciélagos. El análisis filogenético de la ADNpol viral mostró una asociación especie específica para ciertos Hv, mientras que otros se agruparon fundamentalmente por factores ecológicos. El análisis comparativo de los marcadores ADNpol y glicoproteína B, indicó que la ADNpol es más informativa en Hv de *D. rotundus*, mientras que la glicoproteína B resultó más informativa en los Hv de murciélagos insectívoros. Se realizó el primer estudio longitudinal de seguimiento de individuos recapturados, donde analizamos la diversidad de Hv en vampiros (*D. rotundus*).

Esta investigación constituye un aporte al conocimiento de la diversidad y la dinámica espaciotemporal de la circulación viral, con aplicaciones para la conservación y manejo de poblaciones de murciélagos del Uruguay.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Virología / zoonosis emergentes

Palabras clave: virus / murciélagos / biodiversidad /

Introducción

La emergencia de un virus capaz de causar una pandemia, como el SARS-CoV-2 o la ocurrencia de epidemias como la del SARS en 2003, o la introducción en las Américas de arbovirus como Zika (ZIKV) o Chikungunya (CHIKV) puede ser explicada por una combinación de factores, como la aparición de nuevas variantes genéticas, adaptación a nuevos vectores y hospedadores, o factores ecológicos que pueden influir en la dispersión de vectores y/o individuos infectados [1–3].

Desde hace varios años se conoce un amplio rango de vectores y reservorios asociados a la propagación de virus ARN. Los murciélagos (orden Chiroptera) por su amplia distribución, su biología (capacidad de vuelo, hábitos migratorios y alimentarios, comportamiento gregario, longevidad), favorecen la adquisición, mantenimiento y dispersión de virus. Los desplazamientos de sus poblaciones por la intervención del hombre en sus ecosistemas pueden dar lugar a una interacción más estrecha con los animales domésticos y con el hombre, aumentando la posibilidad de transmisión de patógenos [4, 5]. Uruguay cuenta con 22 especies agrupadas en 3 familias: Molossidae, Vespertilionidae y Phyllostomidae. De éstas, 19 se alimentan de insectos, dos de frutas y una de sangre. Los murciélagos insectívoros son los principales depredadores de insectos nocturnos y tienen el potencial de actuar como controladores biológicos de especies nocivas para el hombre por lo que su conservación es una prioridad [6].

Dentro de los virus emergentes más importantes asociados a murciélagos se encuentran los coronavirus (familia Coronaviridae). Entre ellos, se destaca el SARS-CoV-2, causante de la pandemia de COVID-19 y con un origen zoonótico, a partir de murciélagos del género *Rhinolophus*. En la región latinoamericana, estudios recientes han identificado nuevos coronavirus asociados a murciélagos en México, Brasil y Argentina, y estos hallazgos han sido en murciélagos insectívoros de géneros o especies que también habitan Uruguay (*Tadarida brasiliensis*, *Myotis* sp, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* y *M. rufus*) [7–9]. En nuestro país, además del SARS-CoV-2 pandémico, circulan coronavirus bovinos y aviáres como agentes de infecciones gastrointestinales y respiratorias, pero se carece de información sobre coronavirus en murciélagos [10, 11].

La zoonosis históricamente asociada a los murciélagos hematófagos es la rabia, sin embargo, los murciélagos insectívoros y frugívoros pueden también ser portadores y ocasionales transmisores del virus rábico (RABV). Uruguay ha experimentado 3 brotes en bovinos (2007-2010, 2014 y 2017) en dos áreas cercanas a la frontera con Brasil [12, 13]. En

América, gracias a los programas de control y vacunación de cánidos, se ha controlado la circulación doméstica del virus, sin embargo, los reservorios de la fauna silvestre siguen siendo una amenaza para la salud. En la región, se ha investigado el rol de los murciélagos insectívoros en la transmisión de RABV, estimándose la proporción de infectados entre 0,1% y 5,4%. En nuestro país, se han detectado casos en murciélagos insectívoros de 3 especies en forma esporádica.

El género *Alfavirus* (familia *Togaviridae*) agrupa arbovirus de gran relevancia sanitaria. Entre estos, se encuentran los virus de las encefalitis equinas del Este, del Oeste y venezolana (EEEV, WEEV, VEEV). Los ciclos naturales difieren según el virus y pueden involucrar vertebrados (aves, roedores) y uno o más artrópodos vectores; para ciertos alfavirus este ciclo no se conoce con precisión [14]. Varios estudios han reportado evidencias de infección por alfavirus en murciélagos y aunque se desconoce el rol de estos mamíferos en los ciclos naturales, es posible que participen en su dispersión y mantenimiento en la naturaleza. Los alfavirus EEEV, VEEV, Pixuna y CHIKV han sido detectados en murciélagos por serología y en menor medida aislamiento viral y detección genómica. Calisher y cols. reportaron la presencia de VEEV en *D. rotundus* y *T. brasiliensis*, ambos presentes en nuestro país [15–17].

Los Herpesvirus (HV) son virus ADN de amplia distribución y diversidad. Infechan varios grupos de vertebrados, entre ellos los murciélagos. A diferencia de los virus ARN, donde el salto interespecie es un evento frecuente, los herpesvirus mantienen una elevada especificidad virus-hospedero. Esta especificidad los hace interesantes para estudios de coevolución y, en el caso de los murciélagos se ha propuesto el estudio de su diversidad y variabilidad genética como herramienta para medir la conectividad entre colonias.

El conocimiento de la diversidad viral en murciélagos del Uruguay es escaso, siendo el virus rábico el más estudiado. Estudios previos de nuestro grupo han identificado Hv en murciélagos insectívoros y hematófagos, así como la presencia de los virus Rio Negro (RNV, complejo VEEV) y EEEV en insectívoros, hallazgos que resultan originales para el país y la región. Este proyecto propone profundizar en estos hallazgos, iniciar la búsqueda de coronavirus y actualizar el estado de la circulación de virus rábico. Como aporte al manejo y la conservación de estos mamíferos, proponemos utilizar la variabilidad genética de los HV como herramienta para modelar los movimientos poblacionales en el territorio. Esta aproximación es útil para comprender la dinámica de la circulación viral, permitiendo intervenciones más racionales ante la aparición de brotes epidémicos.

Nuestro objetivo es conocer y caracterizar el pool viral en los murciélagos del Uruguay desde un enfoque multidisciplinario. Abordamos diversos aspectos virológicos, así como el modelado ecológico, a fin de comprender la dinámica espaciotemporal de la circulación viral y los brotes. La identificación y el estudio de la diversidad de ciertos virus en murciélagos puede utilizarse como indicador de los movimientos de las poblaciones en el territorio, por lo que su estudio tiene aplicaciones en conservación y manejo de las poblaciones.

Metodología/diseño del estudio

1.- Sitios de muestreo, captura y toma de muestras:

Se realizaron muestreos de entre 3 y 7 días en colonias ubicadas en la Usina de Cuñapirú, Rivera y Gruta Salamanca, Maldonado, y en sitios de actividad conocida en Artigas, Montevideo, Soriano y Lavalleja. Se cuenta con 150 muestras de archivo colectadas en 2018-2019 en Rivera, Artigas, Maldonado y Soriano. La captura y manipulación se realizó de acuerdo con el protocolo N° 879, aprobado por la CEUA de la Facultad de Ciencias

2.- Extracción de ácidos nucleicos totales. La extracción simultánea de ARN/ADN se realizó utilizando kits comerciales de alto rendimiento, basados en la adsorción a partículas de dióxido de sílice y/o el reactivo comercial Trizol® [18, 19].

3.- Identificación y caracterización genética de coronavirus y alfavirus

El estudio de coronavirus en murciélagos se realizó sobre el hisopado rectal y/o saliva, utilizando RT-PCR y/o RT-PCR anidada con blanco en la polimerasa viral, de acuerdo a [8, 20, 21].

La detección y caracterización de alfavirus se realizó en hisopados orales y anales utilizando protocolos de RT-PCR anidadas genéricas y especie específicas según [19, 22, 23]. Los amplicones obtenidos se purificaron y secuenciados con el fin de realizar estudios de filogenia y poblacionales, utilizando las bases de datos y programas de bioinformática de acceso público. En la propuesta original se planteó obtener genomas completos a partir de un grupo de muestras seleccionadas, utilizando secuenciación de nueva generación (NGS). Dado el alto número de muestras analizadas, no fue posible realizarlo por razones financieras. Actualmente nuestro grupo cuenta con una nueva fuente de financiamiento (CSIC GRUPOS I+D) que nos permitirá avanzar en este tipo de ensayos.

4.- Búsqueda de anticuerpos neutralizantes

La identificación de anticuerpos neutralizantes para alfavirus en sangre de murciélagos se propuso a través de PRNT80, utilizando una cepa de campo de RNV y una cepa vacunal de EEEV disponibles en el laboratorio. Estos ensayos se encuentran avanzados, pero aún no finalizados, ya que se decidió estandarizar un método diferente de titulación (DI50).

[19, 24]

5.- Captura, identificación de mosquitos y detección de alfavirus

Se realizaron capturas de mosquitos las salidas de muestreos de murciélagos, se utilizaron trampas CDC cebadas con hielo seco, octenol o levadura. El procesamiento se realizó de acuerdo a lo descrito en [19]. A fin de identificar el vertebrado utilizado como fuente de alimentación, se propuso analizar las hembras alimentadas en pools individuales, por amplificación y secuenciación de COI. Si bien al finalizar el presente proyecto se obtuvo un número bajo de capturas y ninguna hembra alimentada, se estandarizaron varios protocolos para este fin [25, 26]. Se dará continuidad a esta parte del estudio gracias a la financiación obtenida por el grupo, a lo que se suma un convenio actualmente en elaboración con la Intendencia de Montevideo, quienes realizarán capturas en zonas de interés del Departamento.

6.- Aislamiento viral de alfavirus. Se encuentran en marcha los intentos de aislamiento viral a partir de hisopados de muestras identificadas como positivas por RT-PCR, mediante pasajes ciegos en células C6/36 y VeroE6, de acuerdo a [27, 28], con modificaciones.

7.- Identificación y caracterización genética de herpesvirus.

Los HV se identificaron en hisopados orales, por amplificación parcial de la polimerasa viral y de la glicoproteína de superficie gB, seguida de secuenciación y análisis filogenético [18, 29]. De acuerdo a los resultados preliminares, especies que comparten frecuentemente los refugios en Uruguay parecen mostrar mayor similitud en los virus que portan, aun cuando no fueron capturados en las mismas localidades, sugiriendo que la similitud ecológica puede ser más relevante que la filogenética en algunos casos [30]. Los análisis realizados en el presente proyecto nos han permitido profundizar en estos hallazgos.

7.- Secuenciación masiva o de nueva generación (NGS): Considerando el alto número de muestras analizadas y la positividad alcanzada para varios virus, no fue posible, realizar la secuenciación NGS por razones presupuestales. Las muestras y las extracciones se mantienen en óptimas condiciones de conservación, por lo que este trabajo se continuará gracias a una nueva subvención recibida por nuestro grupo de trabajo a fines de 2022.

Resultados, análisis y discusión

Resultados Coronavirus:

Se analizó un total de 329 muestras de hisopados orales ($n= 292$) y anales ($n= 37$) de 20 especies autóctonas de murciélagos muestreados entre los años 2017 y 2022. La muestra positiva (1/329) correspondió al murciélago insectívoro *Molossus molossus* (LMC122) capturado en el Departamento de Río Negro (Palmares Caranday) en el año 2019 (muestras de archivo – insectívoros). La secuencia parcial de RdRp de LMC122 fue editada y alineada junto con 70 secuencias parciales y completas del GenBank representativas de la subfamilia Orthocoronaviridae publicadas previamente, las cuales fueron obtenidas de ejemplares de murciélagos y otros vertebrados. La filogenia de máxima verosimilitud (Figura 1, anexo I) mostró que las secuencias se subdividen en los 4 géneros Alfa-, Beta-, Delta- y GammaCoV, y que LMC122 cae dentro del clado de los alfacoronavirus (Alfa-CoV) ($aLRT = 1$) junto con otras secuencias de murciélagos capturados en Argentina y Brasil. Las secuencias más cercanas con alto soporte de nodo ($aLRT = 0,95$) provenientes de *M. molossus* fueron colectadas en el sur de Brasil en 2009 (KX094984.1) y en Buenos Aires, Argentina en 2020 (OP169153.1). Estas secuencias se encuentran agrupadas con alto soporte ($aLRT= 0.99$) junto a otras secuencias obtenidas de murciélagos del sur de Brasil (*M. rufus*), Jujuy y Chubut, Argentina (*Myotis* sp., *T. brasiliensis*, respectivamente).

Resultados Alfavirus:

Se analizaron 196 hisopados orales ($n= 161$) y anales ($n= 37$) de 11 especies autóctonas de murciélagos muestreados entre los años 2018 y 2022.

Los resultados mostraron que 23 muestras (23/196) resultaron positivas para alfavirus. Los análisis de secuencia mediante Blastn mostraron alto grado de homología con el virus Río Negro (RNV) en 21 muestras y con el virus de la Encefalitis equina del Este (EEEV) en 2 muestras.

Estos virus fueron identificados en 8 especies de murciélagos: *T. brasiliensis*, *M. temminkii*, *M. molossus*, *E. bonariensis*, *Myotis* spp., *E. furinalis*, *E. montanus* y *D. rotundus*, capturados en los departamentos de Artigas, Rivera, Soriano, Lavalleja, Maldonado, Rocha y Montevideo durante los años 2018 y 2022.

Por otro lado, se colectaron un total de 40 mosquitos (Diptera: Culicidae) en un total de 5 capturas, realizadas en los departamentos de Florida y Rivera durante el año 2022. Los ejemplares fueron identificados como *Aedes albifasciatus* ($n=17$), *Culex* spp., ($n= 19$) y *Mansonia* sp. ($n= 4$). Los individuos dañados con falta de caracteres taxonómicos identificatorios se clasificaron solo a nivel de género. La clasificación por captura, especie y sexo permitió agrupar a los ejemplares en un total de 12 pools. De los 40 ejemplares colectados, 38 correspondieron a hembras, 1 a hembra alimentada y 1 macho.

Se extrajo el ARN total de los 12 pools de mosquitos y se analizaron mediante RT-PCR anidada genérica para alfavirus,

con el mismo protocolo utilizado para la detección en murciélagos. Se obtuvieron 2 pools positivos, MOA3 (pool 10) y MOA4 (pool 12), correspondientes a hembras de *A. albifasciatus* capturadas en Paso Pache (Florida), en septiembre y diciembre de 2022. La secuenciación de los productos de amplificación reveló que compartían un alto grado de identidad de secuencia de nucleótidos con RNV y VEEV informados previamente en mosquitos, roedores y murciélagos de Uruguay y Argentina.

Las secuencias de amplificaciones anidadas y/o semianidadas, tanto de murciélagos como de mosquitos, se compararon con secuencias de alfavirus encefalíticos de diferentes complejos antigénicos. El conjunto de datos también incluyó dos secuencias obtenidas en un estudio previo de mosquitos en Uruguay (MG009261 y MG009260) y otras secuencias sudamericanas de Argentina y Colombia. La filogenia de máxima verosimilitud (Figura 2, anexo I) mostró que 21 secuencias virales provenientes de murciélagos y 2 de mosquitos, se agruparon con alto respaldo estadístico ($aLRT = 1$) dentro del clado de RNV. Por otro lado, la secuencia INA29 e INA52 se agruparon en el clado de EEEV linaje I, con apoyo estadístico significativo ($aLRT = 1$), junto con secuencias virales de *Myotis* sp y de *Culex pipiens* reportadas en (Burgueño et al., 2018; Moreira Marrero et al., 2022) respectivamente.

Se observa una amplia distribución geográfica de RNV en murciélagos de varias especies. Los hallazgos más recientes abarcan departamentos del centro- sur de Uruguay, como Soriano, Maldonado, Rocha y Montevideo, sin registros previos de estos virus, sumado a los registros anteriores en Rivera y Artigas. El RNV sigue siendo el más abundante y el más ampliamente distribuido, tanto en número de especies como en rango geográfico. Es de destacar el primer hallazgo de un vampiro positivo a RNV, lo que resulta de interés, considerando que se trata de una especie hematófaga.

El otro alfavirus detectado es el EEEV (linaje I), hasta el momento sólo se encuentra en individuos del género *Myotis* spp, y circula más restringido a la zona Norte del país, específicamente asociado a la colonia de Usina Cuñapirú, y muy emparentado a los EEEV de capturas realizadas en 2015 [31].

En cuanto a los resultados de mosquitos, se encontraron 2 pools positivos para RNV en individuos capturados en el depto. de Florida. Si bien este virus ya se había detectado en el país en diversas localidades y en diferentes especies de mosquitos (Burgueño et al, 2018), en este caso se trata de una nueva especie (*Aedes albifasciatus*). Los mismos fueron colectados en Florida, un departamento donde previamente no se habían detectado mosquitos infectados.

Resultados Herpesvirus

Se analizó un total de 215 muestras de murciélagos pertenecientes a 13 de las 22 especies descritas en Uruguay. La especie muestreada más frecuente fue el vampiro (*D. rotundus*) ($n=92$), seguido de individuos pertenecientes a varias especies del género *Myotis* ($n= 44$) y *Tadarida brasiliensis* ($n=42$), mientras que los murciélagos de las especies *Lasiurus blossevillii* y *Myotis pampa* fueron los menos representados. se logró amplificación genómica en 161 (74.8%) de ellos. Se identificaron murciélagos positivos para herpesvirus en individuos de 11 especies (*D. rotundus*, *E. bonariensis*, *M. temminckii*, *M. molossus*, *T. brasiliensis*, *E. furinalis*, *E. montanus*, *L. ega*, *M. albescens*, *M. levis* y *M. pampa*) capturados en diferentes localidades del país (departamentos de Artigas, Cerro Largo, Maldonado, Río Negro, Rivera y Soriano).

Debido al alto número de muestras positivas que se obtuvieron, especialmente en insectívoros (80), los betaherpesvirus (60) y gammaherpesvirus (20) fueron analizados por separado (Figuras 3 y 4, anexo I).

Se reporta por primera vez la infección por herpesvirus en individuos de las especies *Eumops bonariensis*, *Eptesicus montanus*, *Lasiurus ega* y *Myotis pampa*, siendo los primeros hallazgos en el país y la región. Además, se identificaron posibles nuevos Hv en individuos de las especies *Myotis albescens*, *Myotis levis*, *Eptesicus furinalis*, *Molossus molossus*, *Molossops temminckii*, *Tadarida brasiliensis* y *Desmodus rotundus*. Se encontraron herpesvirus en nuevas localidades del territorio uruguayo: departamentos de Soriano, Río Negro y Cerro Largo. Estos hallazgos amplían el conocimiento previo obtenido en estudios realizados en el país.

El análisis filogenético nos permitió identificar varios clados independientes, tanto dentro de la subfamilia Betaherpesvirinae como en los Gammaherpesvirinae. Específicamente, se observaron varios grupos de Hv con fuerte soporte estadístico, integrados por Hv de murciélagos de diferentes especies como *T. brasiliensis*, *M. albescens*, *M. levis*, *M. pampa*, *M. molossus*, *M. temminckii* y *D. rotundus*, independientemente de la localización geográfica de los individuos infectados. Esto sugiere que la similitud entre los virus se explica fundamentalmente por la identidad de especie de los murciélagos hospedadores y no por su localización geográfica, es decir, sería una asociación especie específica. Sin embargo, hay varias excepciones a este tipo de asociación: por ejemplo, una gran similitud entre virus de especies y/o subfamilias diferentes, pero que comparten refugio (ejemplo: colonia ubicada en la Usina de Cuñapirú), sugiriendo la persistencia de la circulación de virus muy similares infectando individuos en estrecho contacto, independiente de su grado de parentesco taxonómico. Este estudio ha permitido identificar algunos Hv que por su divergencia y posición en la filogenia podrían constituir nuevos virus (Ej., los identificados en *Lasiurus ega* o en *Molossus molossus*, estos hallazgos deben profundizarse, analizando secuencias de mayor longitud (otros genes o genomas completos) y focalizando las capturas a los murciélagos hospedadores.

Se puso a punto la amplificación parcial por PCR anidada de la glicoproteína de superficie gB para los gammahV. El

análisis comparativo de este marcador, junto con la polimerasa viral indica que, a pesar de que la región amplificada pertenece al ectodominio de la gB, esta es menos variable e informativa que la región de la ADN polimerasa viral secuenciada en este estudio. Esto es así, especialmente para *D. rotundus*; sin embargo, la glicoproteína gB resulta más informativa en los Hv de murciélagos insectívoros (Figuras 5A, 5B y Figura 6, anexo I).

Uno de los hallazgos novedosos de este estudio fue el análisis de Hv en recapturas de individuos de la especie *D. rotundus*, en la localidad de Salamanca. Para facilitar la identificación, se marcaron en color verde las muestras correspondientes a murciélagos que fueron recapturados en distintos periodos, identificados como A, B y/o C (Figuras 7 y 8, anexo I).

El análisis los Hv detectados en las recapturas de vampiros nos permitió analizar positividad y la diversidad viral. En el árbol filogenético, se observaron individuos infectados cuyas secuencias fueron idénticas a lo largo del tiempo, consistente con las infecciones persistentes descritas para los Herpesvirus. A su vez, también fue posible identificar la presencia de mutaciones e indels en la región analizada, tal como se evidencia en la secuencia de Hv de la tercera recaptura del individuo DB1813, la cual se agrupó además en otro clado de la filogenia. Considerando el fragmento analizado, este resultado puede interpretarse como infecciones sucesivas por virus distintos, o bien una infección simultánea por dos virus que se reactivan en diferentes momentos. El estudio de los Hv de murciélagos, además de aportar al conocimiento de la diversidad viral en general en estos mamíferos, constituye una herramienta potencialmente útil para indicar contacto y desplazamiento de individuos. Este enfoque resulta de gran relevancia para el monitoreo de otras enfermedades de interés médico y veterinario, tales como el virus de la rabia o los coronavirus [3].

Conclusiones y recomendaciones

En el presente trabajo se detectó y caracterizó por primera vez en Uruguay un AlfaCoV de murciélago en ejemplares de la especie *M. molossus*. Esta identificación se realizó a partir de una muestra de hisopado oral, en un individuo capturado en el departamento de Río Negro en 2019.

Se identificaron alfavirus (RNV y EEEV linaje I) en murciélagos de 7 especies insectívoras (*T. brasiliensis*, *Myotis* sp, *E. montanus*, *E. furinalis*, *M. temmincki*, *M. molossus*, *E. bonariensis*, y por primera vez en una especie hematófaga (*D. rotundus*), en localidades de 10 departamentos del país. Los virus se detectaron a partir de hisopados orales, y por primera vez en hisopados anales. Es importante destacar que las muestras de hisopado (oral o anal) demostraron ser una alternativa eficaz para la obtención de ácidos nucleicos a fin de realizar screening viral, con un manejo fácil y poco invasivo para los animales.

RNV exhibió la mayor prevalencia en murciélagos, una amplia distribución geográfica y el genoma viral se detectó por primera vez en mosquitos de la especie *Ae. (Oc.) albifasciatus* colectados en dos meses distintos del año 2022, en Paso Pache (Florida). Dichos mosquitos fueron capturados en las inmediaciones de las colonias de murciélagos. A su vez, EEEV se encontró más restringido a murciélagos del género *Myotis* y a un ejemplar de *E. bonariensis* capturados en los departamentos de Rivera y Florida.

En 215 muestras analizadas, se observó una alta prevalencia (65%) de herpesvirus en murciélagos. Se identificó por primera vez infección por estos virus en individuos de las especies *E. bonariensis*, *E. montanus*, *L. ega* y *M. pampa*, siendo los primeros hallazgos en el país y la región. A su vez, se encontraron herpesvirus en nuevas localidades del territorio uruguayo, en los departamentos de Soriano, Río Negro y Cerro Largo.

El análisis filogenético permitió identificar varios clados independientes, tanto dentro de la subfamilia Betaherpesvirinae como en los Gammaherpesvirinae. Específicamente, se encontraron 79 muestras positivas para Gamma-Hv y 60 muestras positivas para Beta-Hv. En algunos casos la similitud entre los virus se debe principalmente a la identidad de especie de los murciélagos hospedadores y no a su localización geográfica, lo que indica una asociación especie específica. En otros casos, la similitud entre los herpesvirus está explicada principalmente por factores ecológicos (como compartir refugio) y en menor medida por el grado de parentesco de los hospedadores.

En el contexto del análisis de la diversidad de Hv en vampiros (*D. rotundus*) se realizó el primer estudio longitudinal de seguimiento de individuos recapturados. Este enfoque se presenta como una herramienta que permitiría detectar desplazamiento de individuos, a través de la observación de cambios en los virus, con potenciales aplicaciones en el rastreo de virosis de interés médico y veterinario.

Se puso a punto una PCR anidada para la amplificación parcial de la glicoproteína de superficie (gB) de Gamma-Hv, obteniéndose 21 nuevas secuencias de Hv de murciélagos del Uruguay. El análisis de distancia genética *p*, comparando ambos marcadores (polimerasa y gB), dio como resultado que la polimerasa viral es más informativa o al menos más variable como marcador molecular, especialmente para *D. rotundus*, mientras que la glicoproteína gB resultó más informativa en los Hv de murciélagos insectívoros.

El trabajo multidisciplinario que combina los estudios virológicos con el trabajo de campo y la conservación, son indispensables para una vigilancia continua de patógenos conocidos y nuevos, y ayudará a comprender los mecanismos

subyacentes a la dinámica de las zoonosis emergentes. Este conocimiento es fundamental para generar estrategias de control y prevención de las zoonosis, en conjunción con un manejo adecuado de nuestra fauna autóctona desde una perspectiva de conservación.

Referencias bibliográficas

1. Plowright RK, Reaser JK, Locke H, Woodley SJ, Patz JA, et al. Land use-induced spillover: a call to action to safeguard environmental, animal, and human health. *Lancet Planet Heal* 2021;5:e237–e245.
2. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* (80-) 2004;303:327–332.
3. Botto Nuñez G. Effect of landscape fragmentation on bat population dynamics and disease persistence in Uruguay. Montana State University; 2021.
4. Simmons NB. Evolution. An Eocene big bang for bats. *Science* (80-) 2005;307:527–528.
5. Kunz TH, de Torrez EB, Bauer D, Lobova T, Fleming TH. Ecosystem services provided by bats. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1223:1–38.
6. Botto Nuñez G, González EM, Rodales AL. Conservation of bats (Mammalia: Chiroptera) from Uruguay: Current situation and perspectives. *Mastozool Neotrop* 2019;26:49–64.
7. Lima FEDS, Campos FS, Kunert Filho HC, Batista HBDCR, Carnielli Júnior P, et al. 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* 2013;47:164–167.
8. Marques-Simas P V., Caroline A, Barnabé DS. Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses. *Emerg Infect Dis* 2015;21:729–731.
9. Lucero Arteaga F, Miragaya M, Molina N, Mondino M, Bracamonte C, et al. Identification of coronaviruses in bats and rodents in northern and central Argentina. *Arch Virol*;168. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1007/s00705-023-05703-y.
10. Marandino A, Vagnozzi A, Craig MI, Tomás G, Techera C, et al. Genetic and antigenic heterogeneity of infectious bronchitis virus in South America: implications for control programmes. *Avian Pathol*. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1080/03079457.2019.1583315.
11. Acuña P, Umpiérrez, A. Bengochea V, Berois M, Reolon E, Zunino P. Identificación de *Escherichia coli*, rotavirus y coronavirus bovino asociados a la diarrea neonatal de los terneros en Uruguay. In: XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría. 2013. pp. 166–167.
12. Guarino H, Castilho JG, Souto J, Oliveira R de N, Carrieri ML, et al. Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Res* 2013;173:415–420.
13. Botto Nuñez G, Becker DJ, Plowright RK. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiol Infect* 2019;147:1–8.
14. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*;85. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
15. Fagre AC, Kading RC. Can Bats Serve as Reservoirs for Arboviruses? *Viruses* 2019;11:215.
16. Moratelli R, Calisher CH. Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;110:1–22.
17. Luis AD, Hayman DTS, O’Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proc R Soc B Biol Sci*;280. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1098/RSPB.2012.2753.
18. Wray AK, Olival KJ, Morán D, Lopez MR, Alvarez D, et al. Viral Diversity, Prey Preference, and Bartonella Prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. *Ecohealth* 2016;13:761–774.
19. Burgueño A, Frabasile S, Díaz LA, Cabrera A, Pisano MB, et al. Genomic Characterization and Seroprevalence Studies on Alphaviruses in Uruguay. *Am J Trop Med Hyg* 2018;0:1–8.
20. Anthony SJ, Islam A, Johnson C, Navarrete-Macias I, Liang E, et al. Non-random patterns in viral diversity. *Nat Commun* 2015;6:1–7.
21. Vijgen L, Moës E, Keyaerts E, Li S, Van Ranst M. A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol* 2008;454:3–12.
22. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods* 2001;95:153–161.
23. Pisano MB, Torres C, R?? VE, Far??as AA, S??nchez Seco MP, et al. Genetic and evolutionary characterization of Venezuelan equine encephalitis virus isolates from Argentina. *Infect Genet Evol*;26. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.011.
24. Hozé N, Diarra I, Sangaré AK, Pastorino B, Pezzi L, et al. Model-based assessment of Chikungunya and O’nyong-nyong virus circulation in Mali in a serological cross-reactivity context. *Nat Commun*;12. Epub ahead of print 2021. DOI:

10.1038/s41467-021-26707-9.

25. Reeves LE, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006767.
26. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards S V., Paabo S, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6196–6200.
27. Burgueño A, Frabasile S, Díaz LA, Cabrera A, Pisano MB, et al. Genomic characterization and seroprevalence studies on alphaviruses in Uruguay. *Am J Trop Med Hyg* 2018;98:1811–1818.
28. Carrera J-P, Forrester N, Wang E, Vittor AY, Haddow AD, et al. Eastern equine encephalitis in Latin America. *N Engl J Med* 2013;369:732–44.
29. Ehlers B, Kuchler J, Yasmum N, Dural G, Voigt S, et al. Identification of Novel Rodent Herpesviruses, Including the First Gammaherpesvirus of *Mus musculus*. *J Virol* 2007;81:8091–8100.
30. Moreira L. Detección y caracterización de Herpesvirus en murciélagos del Uruguay como potenciales hospedadores virales. 2019.
31. Moreira Marrero L, Botto Nuñez G, Frabasile S, Delfraro A. Alphavirus Identification in Neotropical Bats. *Viruses*;14. Epub ahead of print 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14020269>.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)