

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE CORONAVIRUS EN MURCIÉLAGOS DE
PANAMÁ
POR
WENDHY FUENTES

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2024

Dedicatoria

Esta investigación es dedicada principalmente a Jesús, Dios todopoderoso, por permitirme culminar mis estudios de maestría con satisfacción y de haber sido partícipe de este proyecto de investigación tan enriquecedor para mi carrera profesional.

A mis padres, hermanos y al resto de la familia, por todo el apoyo brindado durante toda la maestría y en la culminación de este trabajo final.

Y sin lugar a duda, este proyecto está dedicado a mi asesor de tesis, el Dr. Carlos Ramos por haber sido una guía y modelo para seguir durante la maestría y el proyecto de tesis, además, por todo el apoyo que recibí de su parte para poder ser partícipe del proyecto de investigación y realizar mi tema de tesis.

“La motivación puede ayudarte a comenzar, pero solo la disciplina te llevará hasta el final.” James Clear



Agradecimiento

No hay palabras suficientes para agradecer a las personas que se han involucrado en la elaboración de este proyecto de investigación. Ante todo, a Dios le doy las gracias, por haberme permitido llegar a culminar satisfactoriamente este trabajo final. Mi reconocimiento especial, tanto a mi madre como a mi padre, que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera de maestría. Además, a mi hermano, familiares y amigos porque me dieron el apoyo suficiente para nunca perder el enfoque y la fuerza.

A mi asesor de tesis, Dr. Carlos Ramos que estuvo siempre presente para corregirme, impulsarme, guiarme y apoyarme para poder culminar con el trabajo de tesis. De igual forma, a mi co-asesor de tesis el Dr. Edgardo Castro que me apoyo y enseñó durante el proceso, el Dr. Rafael Samudio, la Mgter. Julieta Carrión de Samudio, la Sociedad Mastozoológica de Panamá (SOMASPA), la Universidad de Panamá en el Departamento de Genética y Biología molecular, y a todo el equipo de trabajo en el laboratorio y en el trabajo de campo que estuvieron involucrados en este proyecto.

A todos los profesores del curso de la maestría en Biología Molecular de la Universidad de Panamá, en especial a la Profesora Alana Domingo y la Dra. Magaly de Chial, pues me enseñaron y guiaron durante todo este periodo, por siempre gracias.

Índice General

Dedicatoria.....	II
Agradecimiento	III
Índice de cuadros	VII
Índice de figuras	VIII
Resumen.....	1
Abstract.....	3
Abreviaturas	5
Capítulo I.....	10
Introducción	10
1.1 Planteamiento del problema.....	10
1.2 Justificación	12
1.3 Objetivos	14
1.3.1 Objetivo general.....	14
1.3.2 Objetivos específicos.....	14
1.4 Hipótesis del proyecto	14
1.4.1 Hipótesis nula.....	14
1.4.2 Hipótesis alternativa.....	14
Capítulo II.....	16
Marco teórico.....	16

2.1 Virus causantes de pandemias	16
2.2 Generalidades de los coronavirus	21
2.2.1 Taxonomía.....	21
2.2.2 Estructura.....	25
2.2.3 Replicación	32
2.2.4 Coronavirus y enfermedades infecciosas.....	43
2.3 Murciélagos como reservorios de virus	46
2.3.1 Casos documentados.....	49
2.3.2 Coronavirus en murciélagos	53
2.4 Métodos de detección de coronavirus en murciélagos	56
2.4.1 Inmunológicos	57
2.4.3 PCR en tiempo real.....	59
Capítulo III	61
Metodología	61
3.1 Sitios de colecta.....	61
3.2 Colecta de muestras	62
3.3 Extracción de ARN y síntesis de cDNA	64
3.4 PCR punto final.....	65
3.5 Electroforesis	69

Capítulo IV	71
Resultados	71
4.1 Extracción de ARN y Síntesis de cDNA	71
4.2 Control de Extracción de ARN y Síntesis de cDNA	71
4.3 PCR de las muestras analizadas	76
Capítulo V	80
Discusión	80
Capítulo VI	88
Conclusiones y recomendaciones	88
Literatura citada	89

Índice de cuadros

Cuadro 1. Pandemias causadas por virus a través de la historia.	19
Cuadro 2. Proteínas estructurales del coronavirus.	26
Cuadro 3. Proteínas no estructurales del coronavirus	29
Cuadro 4. Receptores de coronavirus.	34
Cuadro 5. Secuencia de los “primers” IN6 y IN7 que amplifican una región de 440 pb del gen RdRp de coronavirus de murciélagos.	66
Cuadro 6. Secuencia de los “primers” degenerados del gen RdRp para Nested PCR.	67
Cuadro 7. Secuencias de “primers” utilizados como controles.	68
Cuadro 8. Muestras analizadas por especies, sitios de colecta y resultados.	77

Índice de figuras

Figura 1. Transmisión de MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2.....	11
Figura 2.Esquema de clasificación taxonómica de coronavirus.	23
Figura 3. Árbol filogenético de los coronavirus	24
Figura 4. Estructura de los Coronavirus	27
Figura 5. Organización del genoma en los coronavirus.	31
Figura 6. Unión y fusión del virión del coronavirus a la célula huésped y la proteína S con sus subunidades.	37
Figura 7. Replicación y transcripción del coronavirus.....	40
Figura 8. Ciclo de vida de los Coronavirus.....	42
Figura 9. Distribución geográfica de los BtCoV de los géneros Alfacoronavirus y Betacoronavirus.	55
Figura 10.Sitios del área de estudio.....	61
Figura 11. Proceso de colecta de muestras.	63
Figura 12. Productos de amplificación a partir del cDNA de hojas de cítricos infectas con CTV.	73
Figura 13. PCR de Controles y muestras.....	75

Resumen

Los coronavirus se han identificado desde mediados de los años 1960 hasta la actualidad, y en las últimas dos décadas han tomado mayor importancia debido a su propagación. El surgimiento de tres coronavirus con origen ancestral en los murciélagos ha causado diferentes brotes pandémicos en los seres humanos, y con mayor relevancia se encuentra al causante de la pandemia del COVID-19.

Desde la primera epidemia de SARS-CoV en el año 2002-2003, los murciélagos han sido los principales reservorios de los coronavirus zoonóticos que han tomado mayor importancia por la gran probabilidad de ser una fuente evolutiva de varios tipos de coronavirus humanos y animales. Es necesario realizar este tipo de investigaciones, para la mitigación, propagación y como estrategia para controlar futuras pandemias que puedan afectar al ser humano o animales. Este tipo de estudios donde se identifiquen y se estime la prevalencia de coronavirus en murciélagos y otros animales silvestres han sido realizados en otros países de la región, pero no se han realizado recientemente en Panamá.

Para abordar esto, en el presente estudio se analizaron 217 muestras de heces de murciélagos de 48 especies en distintas regiones de la República de Panamá, con el fin de analizar y detectar los diferentes tipos de coronavirus que albergan las distintas especies de murciélagos en nuestro país, brindando un gran aporte científico para futuras investigaciones en la región.

En nuestro estudio no se detectaron positivos para coronavirus en ninguna de las 217 muestras fecales colectadas. Los resultados obtenidos en este estudio no necesariamente implican que los murciélagos en nuestro país no sean reservorios naturales

de coronavirus. Es posible, que la prevalencia de coronavirus en Panamá es muy baja, similar a lo reportado previamente en Panamá (0.9%) e incluso en otros países (0.3%), lo cual requiere de un número mayor de muestras para lograr ser detectados, por ejemplo, más de 700 muestras, como se ha reportado previamente. También, sería más robusto incrementar el número de muestras por especies. Por ejemplo, de las 48 especies analizadas, algunas sólo se lograron capturar un espécimen. El uso de otros métodos más sensibles también podría contribuir a aumentar la probabilidad de detección de positivos en muestras con cargas virales bajas. Se necesitarán más estudios para confirmar estos hallazgos ampliando la cantidad de muestras y usando otros métodos más sensibles de detección.

Palabras clave: Coronavirus, murciélago, reservorio, mitigación, pandemia.

Abstract

Coronaviruses have been identified from the mid-1960s to the present, and in the last two decades they have gained greater importance due to their spread. The emergence of three coronaviruses with ancestral origins in bats has caused different pandemic outbreaks in humans, and with greater relevance is the cause of the COVID-19 pandemic.

Since the first SARS-CoV epidemic in 2002-2003, bats have been the main reservoirs of zoonotic coronaviruses that have gained greater importance due to the great probability of being an evolutionary source of several types of human and animal coronaviruses. It is necessary to carry out this type of research, for mitigation, spread and as a strategy to control future pandemics that may affect humans or animals. These types of studies where the prevalence of coronaviruses in bats and other wild animals are identified and estimated have been carried out in other countries in the region but have not been carried out recently in Panama.

To address this, in the present study, 217 samples of feces from bats of 48 species in different regions of the Republic of Panama were analyzed, to detect the different types of coronaviruses harbored by the different species of bats in our country, providing a great scientific contribution for future research in the region.

In our study, no positives for coronavirus were detected in any of the 217 fecal samples collected. The results obtained in this study do not necessarily imply that bats in our country are not natural reservoirs of coronaviruses. It is possible that the prevalence of coronavirus in Panama is very low, like what was previously reported in Panama (0.9%) and even in other countries (0.3%), which requires a greater number of samples to be

detected, for example, more than 700 samples, as previously reported. Also, it would be more interesting to increase the number of samples per species. For example, of the 48 species analyzed, some only managed to capture one specimen. The use of other more sensitive methods could also contribute to increasing the probability of detecting positives in samples with low viral loads. More studies will be needed to confirm these findings by expanding the number of samples and using other more sensitive detection methods.

Keywords: Coronavirus, bat, reservoir, mitigation, pandemic

Abreviaturas

COVID-19: Enfermedad por coronavirus 2019.

MERS-CoV: Síndrome respiratorio de oriente medio.

SARS-CoV: Síndrome respiratorio agudo severo.

SARS-CoV-2: Síndrome respiratorio agudo severo tipo 2

OMS: Organización Mundial de la Salud.

BatCoV: Coronavirus de murciélago.

RaTG13: Betacoronavirus que infecta al murciélago *Rhinolophus affinis*.

ARN: Ácido ribonucleico.

cDNA: ADN complementario.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

EVE: Virus del Ébola.

Kb: Kilobase. Unidad de longitud de los ácidos nucleicos que corresponde a 1000 nucleótidos.

RdRp: Gen que codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN en los coronavirus.

Pb: Pares de bases.

ICGES: Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.

H₂O: Molécula de agua.

PCR Nested: Reacción en cadena de la polimerasa anidada.

VARV: Virus variólico.

A H₂N₂: Gripe rusa asiática.

A H₁N₁: Influenza virus A subtipo H₁N₁.

H₁N₁: Gripe porcina.

H₂N₂: Gripe asiática.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

T CD₄: Linfocitos T CD₄.

TAR: Tratamiento con antirretrovirales.

BCoV: Coronavirus bovino.

FIPV: Virus de la peritonitis infecciosa felina.

IBV: Virus de la bronquitis infecciosa aviar.

CD: Diarrea de terneros.

WD: Disentería invernal.

FCoV: Coronavirus felino.

FECV: Coronavirus entérico felino.

CSG: Grupo de estudio llamado Coronaviridae Study Group.

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

IQ-TREE: Software eficiente para inferencias filogenéticas.

SH: Prueba filogenética Shimodaira-Hasegawa.

HCoV-NL63: Coronavirus humano NL63.

HCoV-229E: Coronavirus humano 229E.

ssRNA: Ácido Ribonucleico monocatenario positivo.

sg ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero subgenómico.

NTP: Nucleótidos.

ORF: Marcos abiertos de lectura.

nsps: Proteínas no estructurales del coronavirus.

pp1a: Poliproteína 1a del coronavirus.

pp1ab: Poliproteína 1ab.

RBD: Dominio de unión al receptor.

RTC: Complejo de replicación y transcripción.

TRS: Secuencias reguladoras transcripcionales.

RER: Retículo endoplasmático rugoso.

ERGIC: Retículo endoplasmático compartimento intermedio de Golgi.

HCoV: Coronavirus humanos.

TGEV: Virus de las gastroenteritis transmisibles.

PEDV: Virus de la diarrea epidémica porcina.

PHEV: Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina.

PIF: Peritonitis infecciosa felina.

MHV: Virus de la hepatitis murina.

HCoV-OC43: Coronavirus humano OC43.

HCoV-HKU1: Coronavirus humano HKUI.

CoV: Coronavirus.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.

WB: Pruebas de Western Blot.

EIA: Pruebas de inmunoensayo enzimático.

CP: Proteína de la cubierta del virus de la tristeza de los cítricos.

Nad5: Gen mitocondrial de la subunidad 5 de NADH presente en plantas.

dNTPs: Nucleótidos utilizados en la PCR para generar nuevas cadenas de ADN.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

INTRODUCCIÓN

Capítulo I

Introducción

1.1 Planteamiento del problema

Los coronavirus pueden infectar un amplio rango de especies animales incluyendo hurones, aves, camellos, mapaches, gatos, civetas de las palmas enmascarada (*Paguma larvata*) y seres humanos (Maclachlan & Dubovi, 2017; Weiss & Leibowitz, 2011).

Se han identificado desde mediados de 1960 hasta la fecha siete tipos de coronavirus que han infectado humanos (Su et al., 2016; Zhu et al., 2020). Epidemiológica y genéticamente se han obtenido datos que indican que el coronavirus es un patógeno de transmisión zoonótica, y por lo tanto puede transmitir directamente la enfermedad a partir de su reservorio natural o a través de un huésped intermediario, como es el caso del mapache (*Nyctereutes procyonoides*) o el oso hormiguero escamoso (*Manis javanica*) (Abdel-Moneim & Abdelwhab, 2020; Maclachlan & Dubovi, 2017).

Los tres tipos de coronavirus, síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV), síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) presentan una alta patogenicidad y tasa de mortalidad, además, su transmisión es zoonótica (**Figura 1**). El reservorio natural de MERS-CoV es el camello, el de SARS-CoV probablemente es el murciélago y en el caso de SARS-CoV-2 aún no está muy claro cuál es el reservorio responsable de la transmisión; sin embargo, pueden ser especies como el murciélago o alguna otra especie relacionada

(Abdel-Moneim & Abdelwhab, 2020; Díaz-Castrillón & Toro-Montoya, 2020; Peeri et al., 2021; Weiss & Leibowitz, 2011).

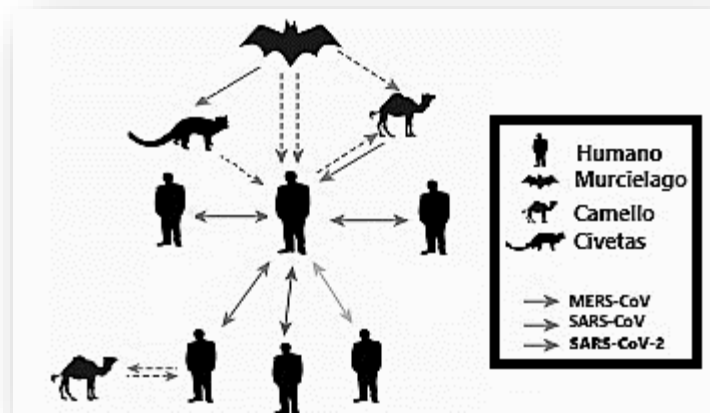


Figura 1. Transmisión de MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2.

El murciélago como reservorio natural del virus transmite a un huésped intermediario como el camello (en el caso de MERS-CoV) y la civeta de las palmas enmascarada (para SARS-CoV). De igual forma el murciélago puede transmitir el virus directamente al humano en el caso de SARS-CoV-2, transmitiendo a otras personas y animales que lo rodean provocando su propagación (Su et al., 2016).

El MERS-CoV, responsable del síndrome respiratorio de oriente medio, fue aislado en 2012 en Arabia Saudí, generó 2,494 de casos, 858 muertes y una tasa de letalidad de 34.4 % (Yang et al., 2020; Zaki et al., 2012). El SARS-CoV, responsable del síndrome respiratorio agudo severo, fue identificado por primera vez en China, produjo un total de 8,422 casos, 919 muertes entre noviembre de 2002 a agosto de 2003 y tiene una tasa de letalidad del 11 %, (Drosten et al., 2003; Ksiazek, 2003; Yang et al., 2020). El SARS-CoV-2 responsable del síndrome respiratorio agudo severo, ha producido a nivel mundial hasta el 11 de febrero del 2024 un total de 774,631,444 casos confirmados con 7,031,216 muertes

y en Panamá ha producido hasta la misma fecha, un total de 1,039,328 casos confirmados con 8,656 muertes, de acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2020).

1.2 Justificación

Una estrategia para predecir y vigilar los riesgos de posibles brotes de coronavirus es estudiar los reservorios naturales del virus, en este caso los murciélagos (Chan et al., 2013). Los murciélagos son mamíferos que conviven en colonias en distintos lugares (cuevas, grietas en rocas, ramas de árboles y estructuras hechas por el hombre). El contacto con otros animales e incluso con el ser humano, facilita las posibilidades de transmisión del virus (Gloza-Rausch et al., 2008; Woo, Lau, & Yuen, 2006). Por lo tanto, es necesario que en nuestro país se implementen programas de vigilancia de estos reservorios naturales dirigidos a detectar y determinar la prevalencia del virus en especies de murciélagos que se encuentran en nuestro país. Este tipo de programa genera información útil para manejo de enfermedades zoonóticas y control de futuras pandemias. En otros países como Alemania, África y México ya se han implementado programas de vigilancia que ayudan en gran medida no sólo a prevenir, predecir o mitigar futuros brotes si no, que además generan información para futuras investigaciones y control de la salud pública (Anthony et al., 2013; Gloza-Rausch et al., 2008; Hernández-Aguilar et al., 2021; Markotter et al., 2020; Nabi et al., 2020).

Los murciélagos pueden ser la fuente de origen de transmisión del virus a humanos, generalmente a través de un intermediario. El genoma del SARS-CoV-2 comparte 96 % de identidad con el coronavirus de murciélago (BatCoV RaTG13), un virus del murciélago de

la especie (*Rhinolophus affinis*) (Zhou et al., 2020). El SARS-CoV-2 al igual que el resto de los coronavirus de origen animal experimentan evolución y recombinación genética ya sea dentro de su reservorio natural o al pasar de una especie a otra. Estos cambios pueden generar variantes con un alto potencial patogénico cuando se transmiten a los humanos (Woo et al., 2009; Woo, Lau, Li, et al., 2006; Woo, Lau, Yip, et al., 2006).

En Panamá se han registrado más de 100 especies de murciélagos de las cuáles es muy probable que algunas sean hospederos naturales de diversos tipos de coronavirus (Samudio, 2007). Sin embargo, no se han realizado hasta la fecha estudios dirigidos a detectar la presencia de coronavirus en murciélagos de Panamá a pesar del potencial riesgo de una transmisión zoonótica. Debido a los diversos brotes y eventos epidémicos y pandémicos asociados a coronavirus es importante detectar la presencia de este tipo de virus en sus reservorios naturales como estrategia para controlar la emergencia y propagación en humanos. Con la generación de nuevas variantes con una mayor tasa de transmisibilidad, es necesario investigar los reservorios naturales de coronavirus, en este caso los murciélagos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la tasa de positividad de coronavirus en especies de murciélagos de la República de Panamá durante los meses de julio del 2021 a octubre del 2022.

1.3.2 Objetivos específicos

- Colectar muestras de heces de murciélagos de diversas especies a nivel nacional desde el mes de julio del 2021 hasta octubre del 2022.
- Extraer ARN a partir de las muestras de heces.
- Generar el cDNA de las muestras obtenidas.
- Determinar la presencia de coronavirus mediante amplificación del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp).
- Secuenciar los productos de PCR de muestras que resulten positivas.
- Identificar mediante análisis filogenético al grupo al que pertenecen las muestras que resulten positivas y la relación con SARS-CoV-2.

1.4 Hipótesis del proyecto

1.4.1 Hipótesis nula

La tasa de positividad de coronavirus en una muestra de murciélagos de Panamá es de cero %.

1.4.2 Hipótesis alternativa

La tasa de positividad de coronavirus en una muestra de murciélagos de Panamá es mayor de cero %.

MARCO TEÓRICO

Capítulo II

Marco teórico

2.1 Virus causantes de pandemias

Los virus se descubrieron a finales del siglo XIX, describiéndose como patógenos causantes de enfermedades que pueden infectar plantas y animales (Gorbalenya, Krupovic, et al., 2020). No obstante, las enfermedades infecciosas de naturaleza pandémica producida por virus han existido a lo largo de la historia de la humanidad, provocando gran cantidad de muertes en el mundo (**Cuadro 1**).

La viruela es causada por un virus que infecta estrictamente a humano, esta enfermedad aparece en el año 1520 al 1980 y causó 56 millones de muertes (Octavio-Aguilar & Tolentino Mendoza, 2023). El virus es llamado variólico (VARV) y es miembro del género *Orthopoxvirus*, posee dos formas víricas: la *variola major* (viruela asiática) con una mortalidad del 20-45% y la forma atenuada del virus la *variola minor* (viruela menor) que causa una mortalidad del 1-2% (Babkin & Babkina, 2015; Berche, 2022). Siendo un virus altamente letal y contagioso, su patogénesis comienza con el ingreso del virus al tracto respiratorio quedando atrapado en las membranas mucosas para pasar a los ganglios linfáticos para tener un breve periodo de viremia y pasar al periodo de latencia de 4 a 14 días, durante este periodo se multiplica en el sistema reticuloendotelial llegando a invadir las membranas mucosas de la boca y faringe (Breman & Henderson, 2002). Este virus invade el epitelio capilar en la piel dando como resultado el desarrollo de lesiones orofaríngeas y cutáneas (Breman & Henderson, 2002).

La fiebre amarilla tuvo su periodo de propagación a finales del siglo XVIII con 100-150 mil muertes (Galeana, 2020). Se encuentra dentro de las llamadas fiebres hemorrágicas virales, esta es causada por el virus de la fiebre amarilla que pertenece al grupo de los arbovirus, en la familia de los *togavirus* y en el género *flavivirs*, con una mortalidad del 5%, llegando a fallecer del 20%-50% de los pacientes en los casos graves (Ángel & Valdés, 2017). Este virus tiene como reservorios naturales a animales como: los monos, cobayos, ratones y el mosquito; siendo el mosquito su transmisor por medio de la picada de este artrópodo, permitiendo de esta forma la penetración del virus por la piel para pasar a los ganglios linfáticos para multiplicarse y pasar a órganos principales para producir necrosis en las células infectadas de los órganos como: hígado, riñones, corazón y medula ósea (Ángel & Valdés, 2017).

El virus de la influenza ha sido partícipe de diferentes brotes de gripes en la antigüedad desde la llamada Gripe rusa asiática (A H2N2) de 1889 a 1890 con 1 millón de muertes, posteriormente entre los años 1918 a 1919 surge la Gripe o influenza española (AH1N1) que cobró con 50-100 millones de vidas, la Gripe asiática (H2N2) en los años 1957 y 1958 con alrededor de 1.1 millones de muertes y la Gripe porcina (H1N1) del 2009 al 2010 con 575mil muertes (Galeana, 2020; Huerta López, 2014). Este virus es uno de los más contagiosos por su alta capacidad de mutación en su genoma, por esta razón los anticuerpos suministrados en vacunas anuales contra el virus solo protegen de forma parcial al paciente, por lo tanto se debe modificar anualmente nuevos determinantes antigénicos (Huerta López, 2014).

El VIH-SIDA ha existido desde 1981 al presente con aproximadamente 41 millones de muertes (Cordero, 2017). El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus que genera una afección al sistema inmune, provocando una inmunodeficiencia en el sistema, debido a que los linfocitos T CD4 son eliminados poco a poco del sistema inmune de la persona enferma sin tratamiento con antirretrovirales (TAR) (Cordero, 2017). La resistencia del virus es uno de los principales desafíos para la cura de la infección, ya que, desde que el virus entra en el organismo el sistema inmunológico no puede reconocer y atacar al VIH en fase latente (Chen et al., 2022).

El virus del Ébola (EVE) es un virus que pertenece a la familia *filoviridae*, dentro del género *Ebolavirus*, identificada desde 2014 a 2016 con 11.3 mil muertes aproximadamente, siendo una enfermedad que provoca fiebre hemorrágica, con una tasa de mortalidad alta con el 50% (Kiiza et al., 2020). El reservorio natural de este virus es principalmente el murciélago, siendo considerado un virus zoonótico, el virus al ingresar al organismo por medio de las membranas mucosas y llega a atacar a las células dendríticas, monocitos y macrófagos, para poder llegar a los ganglios linfáticos y poder multiplicarse y provocar daño tisular (Kiiza et al., 2020).

Los coronavirus son otros virus que han provocado pandemias a lo largo de la historia comenzando con el SARS-CoV del 2002 al 2003 con 919 muertes, el MERS-CoV desde el 2012 al presente con 850 muertes y el Coronavirus (SARS-CoV-2) desde el 2019 al presente con 5.96 millones de muertes (Yang et al., 2020).

Cuadro 1. Pandemias causadas por virus a través de la historia.

Las pandemias a través de la historia		
Pandemia	Siglo/Año	Número de muertes
Viruela	1520-1980	56M
Fiebre amarilla	Finales S. XVIII	100-150K
Gripe Rusa	1889-1890	1M
Gripe española	1918-1919	50-100M
Gripe asiática	1957-1958	1.1M
VIH-SIDA	1981-presente	41M
SARS	2002-2003	919
Gripe porcina	2009-2010	575K
ÉBOLA	2014-2016	11.3K
MERS	2012-presente	850
Coronavirus (COVID-19)	2019-presente	5.96M

M=Millones, K=Miles

Historia de pandemias generadas por diferentes tipos de virus (Octavio-Aguilar & Tolentino Mendoza, 2023; Yang et al., 2020).

En la actualidad se ha evidenciado que los virus que se encuentran estrechamente relacionados taxonómicamente han evolucionado y provocado pandemias catastróficas que afectan al ser humano e incluso a los animales, siendo estos últimos huéspedes naturales de estos agentes infecciosos.

Desde mediados de la década de 1960, se han identificado los coronavirus humanos, un tipo de virus que puede afectar diferentes huéspedes incluyendo el ser humano y otras especies animales (Kahn & McIntosh, 2005). Dentro de los coronavirus humanos causantes de pandemias a lo largo de la historia tenemos al SARS-CoV identificado por primera vez en el año 2002, MERS-CoV identificado en la Península Arábiga en el 2012 y el más virulento el SARS-CoV-2 identificado en el año 2019 (Drexler et al., 2014). Sin embargo,

desde finales de la década de 1930 se identificaron coronavirus de animales, que afectan bovino, felinos y otras especies. Algunos ejemplos de estos virus son: el coronavirus bovino (BCoV), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) y el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV)(Drexler et al., 2014).

El BCoV es un tipo de coronavirus que causa enfermedades entéricas y respiratorias en las vías superiores e inferiores en el ganado y se encuentra relacionado con el coronavirus en humanos, aunque existe variabilidad entre las cepas del BCoV en el gen S (espiga). Es un virus de ARN monocatenario y pertenece a la familia Coronaviridae, género Betacoronaviridae (Zhu et al., 2022). La transmisión de este virus es entre especies vía fecal-oral y respiratoria causando síntomas de diarrea y afecciones en el tracto respiratorio en el ganado (Zhu et al., 2022). El virus está relacionado con distintos síndromes en el ganado como: la diarrea de terneros (CD), disentería invernal (WD) con diarrea hemorrágica en adultos e infecciones respiratorias (Saif, 2010).

El coronavirus felino (FCoV) pertenece a la familia *Coronaviridae* y género *Alphacoronavirus*; tienen una prevalencia del 90% en los animales que conviven con más de dos gatos domésticos o silvestres (Valencia et al., 2021). Se infectan de forma oro-nasal y el animal presenta sintomatología respiratoria, en el tracto respiratorio superior. Se dividen en dos biotipos: el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) y el coronavirus entérico felino (FECV), el FECV afecta a los enterocitos, el animal presenta síntomas de enteritis leves, cabe resaltar que cuando se producen mutaciones genómicas en este tipo de virus, estos se convierten en el biotipo FIPV que produce infección en los monocitos y macrófagos(Valencia et al., 2021).

El virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) por coronavirus aviar, pertenece a la familia *Coronaviridae* y al género *Deltacoronavirus*; suele afectar a las aves de la especie *Gallus gallus* (Quinteros et al., 2022). Se replica en el tracto respiratorio superior y entra a las células huésped por viropexis, se caracteriza por que el animal presente conjuntivitis, estertores traqueales, tos, estornudos y secreción nasal; provocando lesiones en múltiples partes del tracto reproductivo y sus células diana son las ciliadas y granulares(Quinteros et al., 2022).

La característica general de estos coronavirus es que producen infecciones respiratorias y entéricas. Las infecciones producidas por estos virus afectan las vías respiratorias superiores y desarrollan dificultad para respirar llegando a necesitar la ayuda de respiración mecánica (Octavio-Aguilar & Tolentino Mendoza, 2023; Weiss & Leibowitz, 2011).

2.2 Generalidades de los coronavirus

2.2.1 Taxonomía

Los coronavirus pertenecen al reino *Riboviria*, orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* y poseen cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (**Figura 2**) (Octavio-Aguilar & Tolentino Mendoza, 2023). El género *Betacoronavirus* se subclasifica en cuatro linajes (A,B,C y D), en el 2018 se reclasificaron estos linajes como subgénero de *Betacoronavirus* y se renombraron de la siguiente manera: *Embecovirus* (anteriormente A), *Sarbecovirus* (anteriormente B), *Merbecovirus* (anteriormente C), *Nobecovirus* (anteriormente D) y se agregó el *Hibecovirus* (Wong et al., 2019). Los géneros *Alphacoronavirus* y

Betacoronavirus afectan solo a mamíferos y su origen se encuentra en el murciélago (Kahn & McIntosh, 2005). Los *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* infectan aves y algunos de estos pueden infectar a los mamíferos (Cui et al., 2019).

Un grupo de estudio llamado *Coronaviridae* Study Group (CSG) perteneciente a el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), se encarga de la clasificación de los virus y la nomenclatura taxonómica de la familia *Coronaviridae* (Das et al., 2021). El nuevo coronavirus fue identificado en el 2019 y el CSG le asignó el nombre de SARS-CoV-2 basándose en el nombre ya establecido para virus de esta especie y en relación a la distancia de este nuevo virus con el SARS-CoV, en un árbol filogenético de distancia de coronavirus (Gorbalenya, Baker, et al., 2020).

Específicamente el SARS-CoV-2 se agrupa filogenéticamente en un mismo clado que el SARS-CoV para la especie de coronavirus relacionada con el síndrome respiratorio agudo severo, a diferencia con MERS-CoV, que se encuentra más distante filogenéticamente de SARS-CoV y SARS-CoV-2 (**Figura 3**) (Gorbalenya, Baker, et al., 2020). Sin embargo, tanto SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV se encuentran en el género, *Betacoronavirus* (Yan et al., 2020).

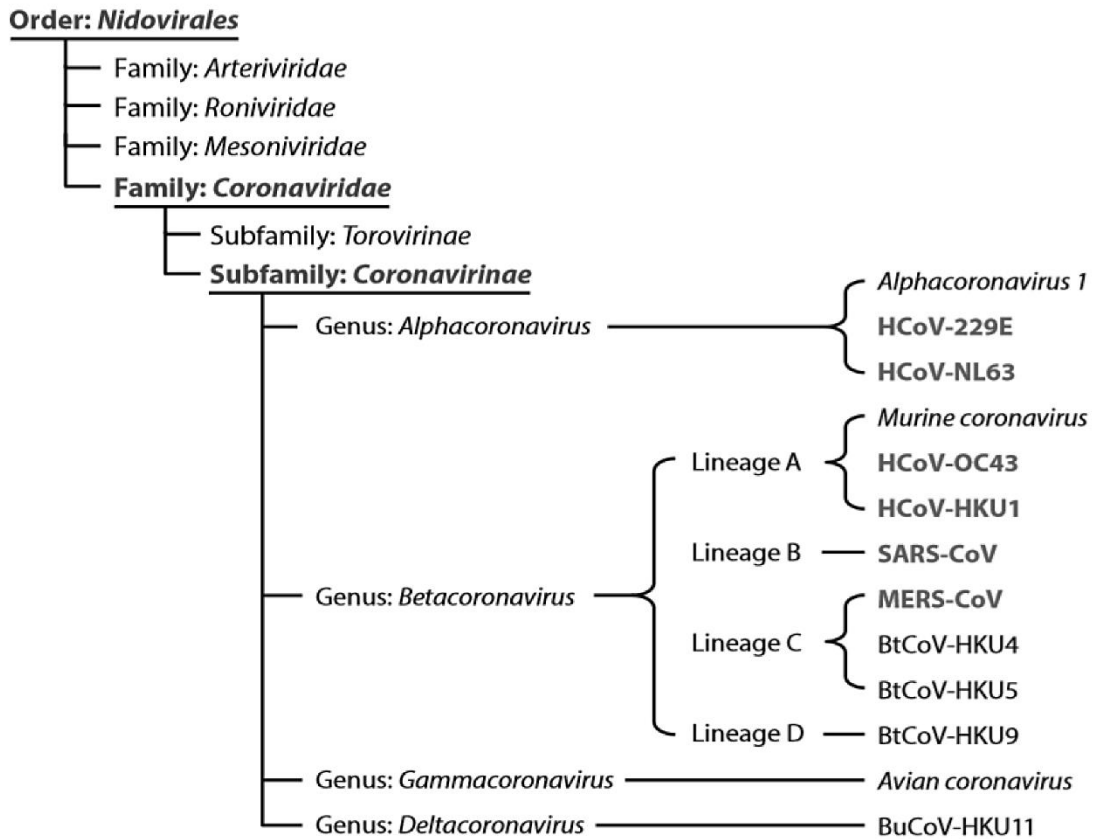


Figura 2. Esquema de clasificación taxonómica de coronavirus

En la imagen se aprecia la taxonomía de los coronavirus desde su orden (*Nidovirales*), familia (*Coronaviridae*), subfamilia (*Coronavirinae*) y sus cuatro géneros (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus*). En el género *Betacoronavirus* se presentan los linajes A, B, C y D. Orden “Order”, familia “Family”, subfamilia “Subfamily”, género “genus” y linaje “lineage” (Yan et al., 2020).

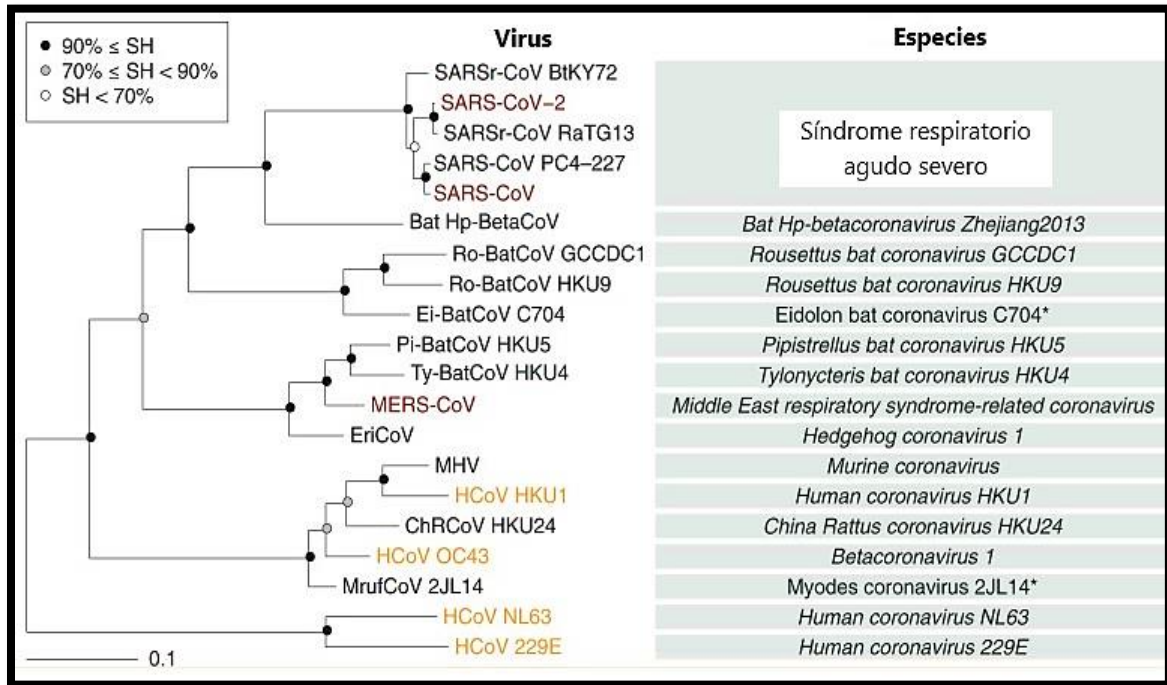


Figura 3. Árbol filogenético de los coronavirus.

Árbol filogenético de máxima probabilidad IQ-TREE que representa trece especies de virus y cinco representantes de Coronavirus del género *Betacoronavirus* relacionados con el síndrome respiratorio agudo severo. El soporte de las ramas se estimó usando la prueba de Índice de probabilidad aproximada de Shimodaira-Hasegawa (SH) con 1000 réplicas. El árbol tiene como raíces a los virus HCoV-NL63 y HCoV-229E, que representan dos especies del género *Alphacoronavirus*. El rojo intenso representa los virus zoonóticos con patogenicidad variable en humanos y el color amarillo a virus respiratorios comunes que circulan en humanos. Los asteriscos indican especies de coronavirus cuyas demarcaciones y nombres están por aprobación de la ICTV y por esta razón los nombres no están en cursiva (Gorbalenya, Baker, et al., 2020).

2.2.2 Estructura

Los coronavirus son virus de ARN monocatenario (ssRNA) de cadena positiva, se caracterizan por producir un ARN mensajero subgenómico (sg ARNm) que se encarga de codificar proteínas estructurales y accesorias (Subissi et al., 2014). Los viriones consisten en una envoltura (membrana externa) compuesta de lípidos y proteínas, muchas de ellas derivadas de la célula en la cual el virus se ensambla. Las proteínas asociadas a la membrana externa son: la proteína de membrana (M), la de envoltura (E) y la glicoproteína principal llamada espiga (S) en forma de punta que le otorga al virión un parecido a una corona, de ahí su nombre coronavirus (**Figura 4**) (Octavio-Aguilar & Tolentino Mendoza, 2023; Payne, 2017). La envoltura rodea la nucleocápside que contiene el material genético que está asociado a una proteína llamada nucleoproteína (N) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Proteínas estructurales del coronavirus.

Proteínas estructurales	Abreviatura	Función
Glicoproteína espiga	S	Proteína glicosilada que sirve para la unión y fusión del virus en la célula.
Proteína de membrana	M	Proteína más abundante del virión, contiene tres dominios hidrofóbicos, juega un papel importante en la cobertura y le brinda una curvatura a la membrana.
Proteína nucleocápside	N	Proteína que forma homodímeros y homooligómeros y se une al ARN genómico, empaquetándolo en una nucleocápside larga y flexible. Papel importante en el ensamblaje y gemación del virión, modulación del ciclo celular e inhibición de la traducción de la célula huésped.
Proteína de envoltura	E	Proteína en menor cantidad en el virión, se ensambla en membranas para formar canales iónicos, es una viroporina (que influyen en el equilibrio electroquímico en los compartimientos subcelulares).
Proteína Hemaglutinina esterasa	HE	Glicoproteína que se une a unidades de ácido siálico en glicoproteínas y glicolípidos, su actividad esterasa elimina los grupos acetilo del ácido siálico O-acetilado, por lo que es una enzima destructora de receptores. Se encuentra en algunos <i>Betacoronavirus</i> .

Se presentan las proteínas estructurales de los coronavirus con su respectivo nombres, abreviatura y función que cumplen en el virus (Payne, 2017).

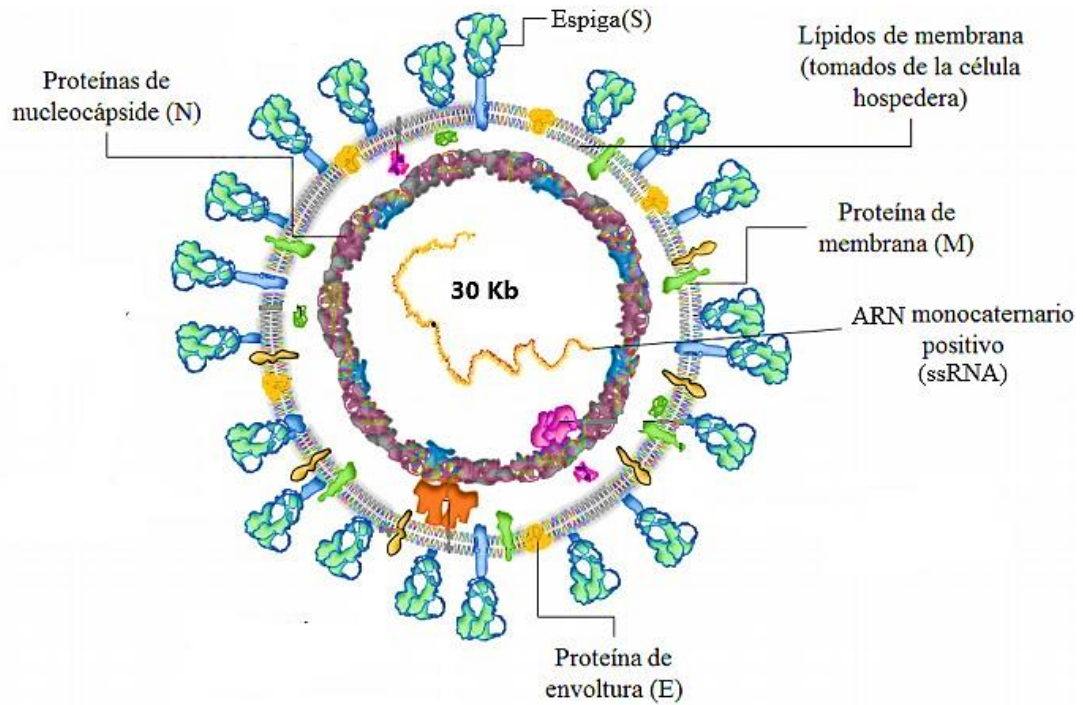


Figura 4. Estructura de los Coronavirus

Se observan las proteínas estructurales M, E, S y N. La proteína S se proyecta hacia fuera de la envoltura. El material genético ssRNA con una longitud de 30 kb se observa dentro de la nucleocápside (Octavio-Aguilar & Tolentino Mendoza, 2023).

Los coronavirus son considerados virus grandes y generalmente esféricos con un diámetro de entre 100 a 160 nm de ancho, su genoma varía de 25 a 32 kilobases (kb), siendo este uno de los genomas de virus de ARN más grandes hasta el momento conocidos (Cui et al., 2019; King et al., 2011; Maclachlan & Dubovi, 2017). El genoma de este virus está compuesto por aproximadamente 29.903 nucleótidos (NTP) y 10 marcos abiertos de lectura (ORF) (Payne, 2017). Los dos tercios del genoma se encargan de codificar proteínas no estructurales (nsps) necesarias para la transcripción y replicación del genoma viral. En el extremo 5´ se encuentra el gen de la replicasa, compuestos por dos ORF llamados 1a y 1b, y en el extremo 3´ se encuentra una cola poliA (King et al., 2011). El ORF1a codifica la poliproteína 1a (pp1a) escindida por proteasas del virus en once proteínas no estructurales (nsp1-nsp11), en el ORF1b se codifican cinco proteínas no estructurales (nsp12-nsp16) luego del procesamiento por proteasas virales que se encuentran en la poliproteína 1ab (pp1ab) (**Cuadro 3**) (**Figura 5**) (Subissi et al., 2014).

En el genoma del coronavirus hay diferentes tipos de nsps y dentro de estas se encuentra la (nsp12), esta es la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) con 930 aminoácidos.

Cuadro 3. Proteínas no estructurales del coronavirus

Proteínas no estructurales	Función
nsp 1	Antagonista de la inducción y señalización del interferón(IFN) (no se encuentra en todos los coronavirus). Bloquea la traducción del ARNm de la célula huésped o promueve la degradación del ARNm celular del ARNm del huésped, incluido el ARNm del interferón.
nsp 2	No conocida, se une a proteínas prohibitivas
nsp 3	Dominios de proteasa tipo papaína/deubiquitinasa bloquea la activación de IRF-3 y la señalización de NF-κB. Dominios tipo ubiquitina1 (Ubi1) y ácido interactúan con la proteína N. Mac2,Mac3,PLpro bloquea la acción p53. Mac1, Mac2, Mac3(macrodominios tienen actividad ADP-ribosilhidrolasa), interfiere con la actividad antiviral inducida por IFN, promueve la expresión de citocinas proinflamatorias del huésped. Dominios Ubi2,unión de ácido nucleico (NAB), G2M, y funciones desconocidas.
nsp 4	Proteína de Andamio transmembrana,interviene en la remodelación de membranas y estructura adecuada de las vesículas de doble membrana (DMV).
nsp 5	Proteasa principal (Mpro), escinde la poliproteína viral e inhibe la inducción del INF.
nsp 6	Proteína de Andamio transmembrana.
nsp 7	Cofactor con nsp8,formando un gran complejo con nsp8 para unirse a nsp12. Es responsable de la replicación y transcripción del genoma viral
nsp 8	Actúa como cofactor con nsp7,formando un gran complejo con nsp7 para unirse a nsp12. Responsable de la replicación y transcripción del genoma viral. El complejo puede funcionar como una abrazadera de procesividad para el RdRp.
nsp 9	Proteína de unión a ARN monocatenario.
nsp 10	Cofactor de unión al zinc para la 2'-O- metiltransferasa (nsp16) y nsp14, formando heterodímeros con ambos y estimula la actividad ExoN y 2-0-MT. Contribuye a la fidelidad de la replicación CoV.

nsp 12	ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRd). Se une a sus cofactores esenciales, nsp7 y nsp8, para ensamblar el complejo de síntesis de ARN
nsp 13	5' trifosfatasa (síntesis de cap), ARN helicasa
nsp 14	N7-metiltransferasa, agrega cap 5'a los ARN virales. Exonucleasa Exo N3'-5' (proporciona una función de corrección para el coronavirus RdRp). Interfiere con la actividad antiviral inducida por IFN.
nsp 15	Endonucleasa viral Nendo U (escinde el ARN monocatenario y bicatenario aguas debajo de los residuos de uridilato, produciendo 2 a 3 fosfatos cíclicos).
nsp 16	2'-O-metiltransferasa(2'-O-MT) (síntesis de cap) Protege el ARN viral del reconocimiento de la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5).

Productos de poliproteínas 1a y 1b.

Se muestran las 16 proteínas no estructurales (nsp1-nsp16) con el nombre y la función. (Payne, 2017; Y. Wang et al., 2020).

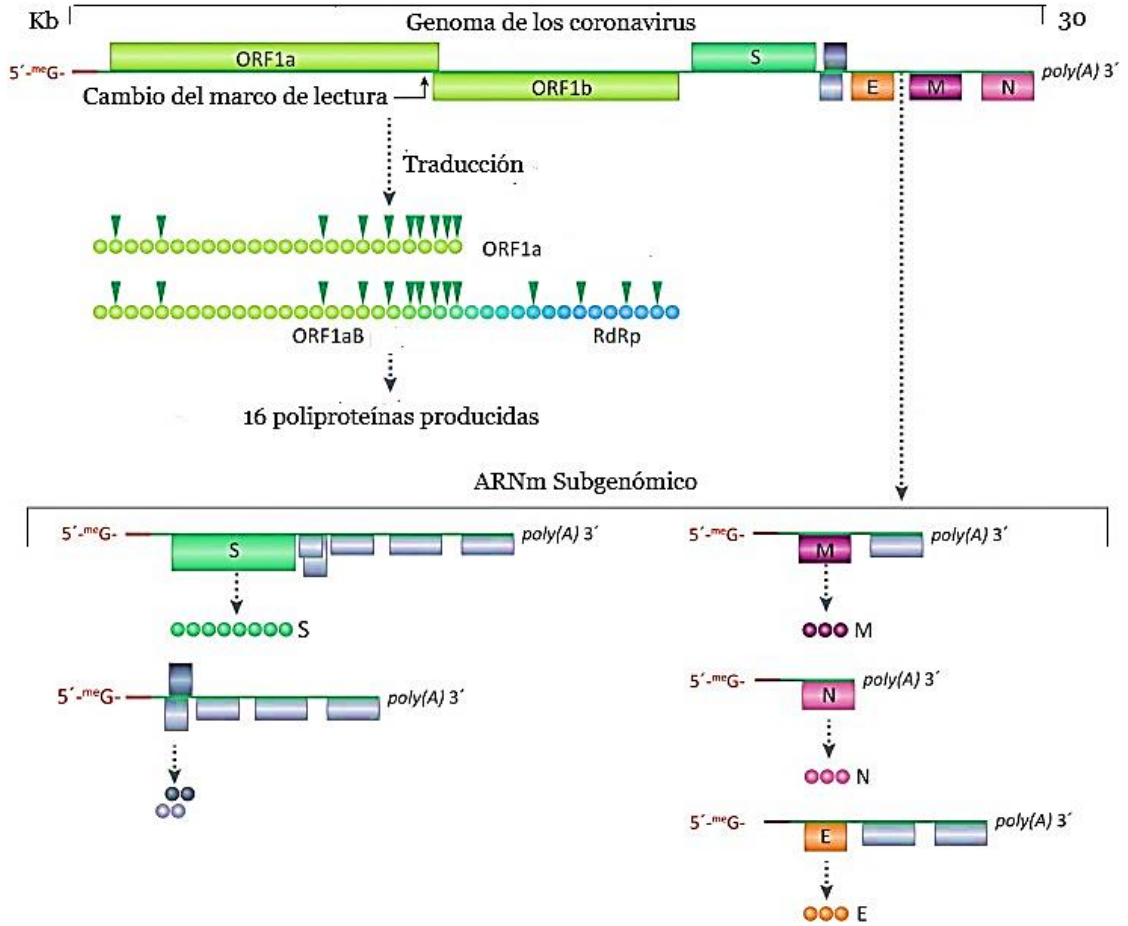


Figura 5. Organización del genoma en los coronavirus

El genoma del coronavirus con su tamaño aproximado, su organización, comenzando con el extremo 5', seguido de la región del ORF1a, ORF1b y la región de los ORF que codifican las proteínas estructurales (S, E, M y N) (Payne, 2017).

2.2.3 Replicación

En los coronavirus la transcripción y la replicación del genoma viral se realiza en el citoplasma (Payne, 2017). Sin embargo, antes de que ocurran estos procesos es necesario que el virus entre en la célula. Una vez en el interior, el virus utiliza la maquinaria de la célula para producir los viriones e infectar otras células sanas.

La entrada del virus a la célula huésped puede ser por medio de dos rutas: la endocitosis o la fusión directa con la superficie celular (Cabanillas, et al., 2021). En la ruta de endocitosis el virus es encapsulado por el endosoma, luego de la unión al receptor, es necesario un ambiente ácido generado por la disminución del pH mediada por lisosomas, el cual se requiere para la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Cabanillas, et al., 2021). Por otro lado, la ruta de la fusión directa con la superficie celular ocurre después de la unión del dominio de unión al receptor (RBD) de la subunidad S1 de la proteína S del virus con el receptor, esta fusión ocurre con la escisión proteolítica que permite la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped (Cabanillas, et al., 2021).

La unión del virus con la célula huésped ocurre mediante la interacción de la proteína estructural del virus, la proteína S y un receptor. Existen diferentes receptores dependiendo del tipo de coronavirus. (**Cuadro 4**) (Fehr & Perlman, 2015). Los sitios donde se une la proteína S y el receptor se denominan sitios de los dominios de unión al receptor (RBD) y la posición donde se localizan estos sitios varía según el virus, sin embargo, la unión de proteína S y receptor es uno de los principales determinantes para que el virus infecte a la célula huésped, esta unión entre proteína S y receptor da lugar a que la proteína

S se coloque muy cerca de alguna proteasa de la célula huésped para que se realice el siguiente proceso (Fehr & Perlman, 2015; Maclachlan & Dubovi, 2017).

Cuadro 4. Receptores de coronavirus.

Virus	Receptor
Alfacoronavirus	
Coronavirus canino (CCoV)	Aminopectidasa N canina(cAPN)
Coronavirus felino (FCoV)	Aminopectidasa N (APN) o lectina tipo C de células dendríticas (DC-SING)
Coronavirus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV)	Aminopectidasa N felina (fAPN)
Coronavirus humano 229E (HCoV-229E)	Aminopectidasa N humana (hAPN)
Coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63)	Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)
Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV)	Aminopectidasa N (APN)
Coronavirus respiratorio porcino (PRCoV)	Aminopectidasa N porcina (pAPN)
Virus de gastroenteritis transmisible (TGEV)	Aminopectidasa N porcina (pAPN)
Betacoronavirus	
Coronavirus de la hepatitis murina (MHV)	Molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1) murino
Coronavirus bovino (BCoV)	Patrón de ácido 5-N-acetil-9-O-acetilneuramínico (Neu5,9Ac2)
Coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43)	Patrón de ácido 5-N-acetil-9-O-acetilneuramínico (Neu5,9Ac2)
Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV)	Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)
Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo (SARS-CoV-2)	Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)
Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV)	Dipeptidil peptidasa 4 (DPP4)
Coronavirus de murciélago (RaTG13)	Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)

Gammacoronavirus	
Virus de la bronquitis infecciosa (IBV) por coronavirus aviar	Ácido siálico con enlaces alfa2,3
Deltacoronavirus	
Deltacoronavirus porcino (PDCoV)	Polisacáridos no almidonosos (PNA) Porcino

Receptores de membrana de diferentes tipos de coronavirus con su nombre y abreviatura (Cantoni et al., 2022; Fehr & Perlman, 2015; Huang et al., 2020; Quinteros et al., 2022; Valencia et al., 2021; Y. Wang et al., 2020).

Luego de la unión de la proteína del virus al receptor, ocurre la fusión de la membrana viral con la celular, el proceso ocurre mediante escisión proteolítica por medio de una catepsina o proteasa (como la TMPRSS2), propiciando un ambiente ácido en el medio (Fehr & Perlman, 2015). Es importante mencionar que la proteína S está conformada por dos subunidades la S1 (esta región contiene el RBD) y S2 (contiene el dominio (HR) y dentro de este HR1 y HR2), el proceso de escisión de la proteína S se produce en dos sitios: dentro de la porción del límite de S1/S2 (en esta escisión el RBD y el dominio de fusión de la proteína S son separados por medio de la catepsina L) y la escisión en la porción S2' (esta escisión expone el péptido de fusión (FP) que se inserta en la membrana celular) (Fehr & Perlman, 2015; Payne, 2017). Las subunidades HR1 y HR2 forman un haz de seis estructuras helicoidales (6-H), siendo este un componente esencial para la fusión viral, ya que, esta estructura favorece la unión en la membrana de la célula huésped, teniendo como resultado la fusión de las dos membranas virus-célula diana y por consiguiente la liberación del genoma viral en el citoplasma (**Figura 6**) (Huang et al., 2020).

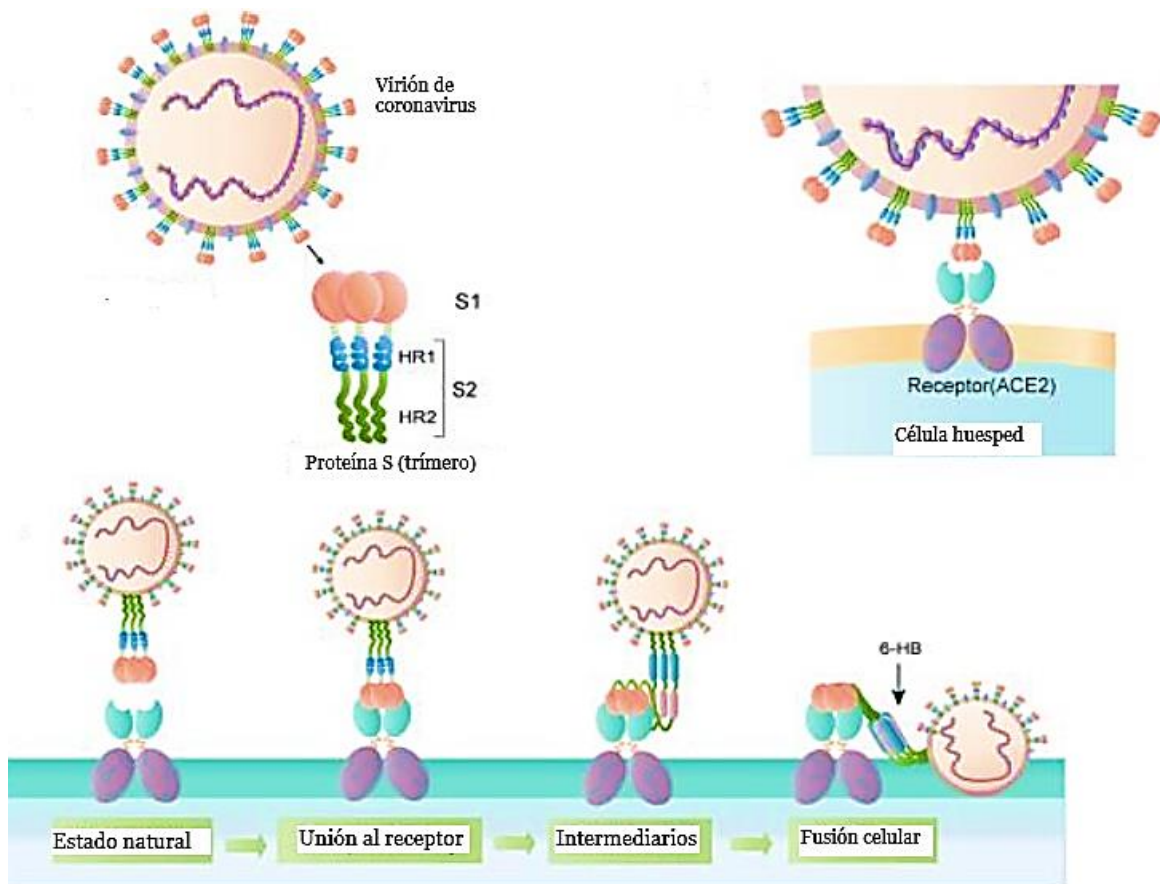


Figura 6. Unión y fusión del virión del coronavirus a la célula huésped y la proteína S con sus subunidades (Huang et al., 2020).

Una vez el virus entra a la célula diana, comienza el proceso de traducción del genoma viral por medio de los ribosomas de la célula infectada, luego a partir del ARN genómico del virus se traducen las poliproteínas (pp1a) y (pp1b), partes de los dos ORF del genoma viral (Simabuco et al., 2021). La pp1b se produce en fusión con la pp1a por medio de un desplazamiento de marco de lectura -1, generando la pp1a (sin desplazamiento de marco) y la pp1ab (con desplazamiento de marco) (Fehr & Perlman, 2015; Simabuco et al., 2021). El cambio de marco de lectura se produce por la secuencia en el genoma 5'-UUUAAAC-3' y una estructura secundaria del ARN posicionada antes del codón "stop" del ORF pp1a, provocando una pausa en la lectura del ribosoma y la traducción de pp1b ORF fusionado con pp1a ORF, generando la poliproteína pp1ab (Fehr & Perlman, 2015).

Las poliproteínas pp1a y pp1ab, son objeto de escisión proteolítica para formar las proteínas no estructurales (nsp1-nsp16). La escisión se genera por medio de 2 proteasas: nsp3 y nsp5, la escisión con nsp3 genera nsp1, nsp2 y nsp3, y nsp5 escinde otros sitios para generar las proteínas no estructurales faltantes (Simabuco et al., 2021).

La proteína no estructural nsp12, es la ARN polimerasa dependiente de ARN, y se encarga de ensamblar el complejo de replicación y transcripción (RTC) (Simabuco et al., 2021). El RTC se encarga de generar ARN negativos monocatenarios (ssARN-), incluyendo copias de ARN genómico y de los ARN subgenómico que sirven como plantillas para producir el genoma y el ARNm (Simabuco et al., 2021).

La replicación del genoma viral comienza con la síntesis de copias en sentido negativo que funcionan como plantilla para sintetizar ARN genómico de sentido positivo, cabe mencionar que los coronavirus del orden *Nidovirales* tienen una transcripción

discontinua (V'kovski et al., 2021). Los ARN genómicos sintetizados se utilizan para la traducción y la producción de nsps y el RTC, esto ocurre por medio de la producción de un conjunto de ARN subgenómicos coterminales 5' y 3' anidados (V'kovski et al., 2021). En la producción del ARN de sentido negativo el RTC interrumpe la transcripción al encontrarse con las secuencias reguladoras transcripcionales (TRS), situadas aguas arriba de los ORF de las proteínas estructurales en el tercio 3' del genoma viral (Simabuco et al., 2021; V'kovski et al., 2021). En los TRS la síntesis de ARN de sentido negativo se detiene y se reinicia en el TRS adyacente a una secuencia líder (TRS-L) ubicada a 70 nucleótidos del extremo 5' del genoma (V'kovski et al., 2021) La discontinuidad de la síntesis del ARN del coronavirus involucra la relación entre los TRS complementarios del ARN negativo naciente y el ARN genómico positivo (TRS-L sentido positivo), cuando se reinicia la síntesis de ARN en la región TRS-L, se agrega la copia de la cadena negativa de la secuencia líder del ARN naciente con el propósito de completar la síntesis de los ARN subgenómicos negativos (**Figura 7**) (V'kovski et al., 2021). La discontinuidad de la síntesis del ARN negativo tiene como resultado generar un conjunto de ARN subgenómico negativo que se utiliza como plantilla para la síntesis de un conjunto anidado característico del ARNm subgenómico positivo que se utiliza para la traducción de proteínas estructurales y accesorias (Simabuco et al., 2021; V'kovski et al., 2021). Generalmente los coronavirus se recombinan mediante recombinación homóloga y no homóloga, esta capacidad se encuentra relacionada con la capacidad del cambio de cadena de la RdRp (Fehr & Perlman, 2015).

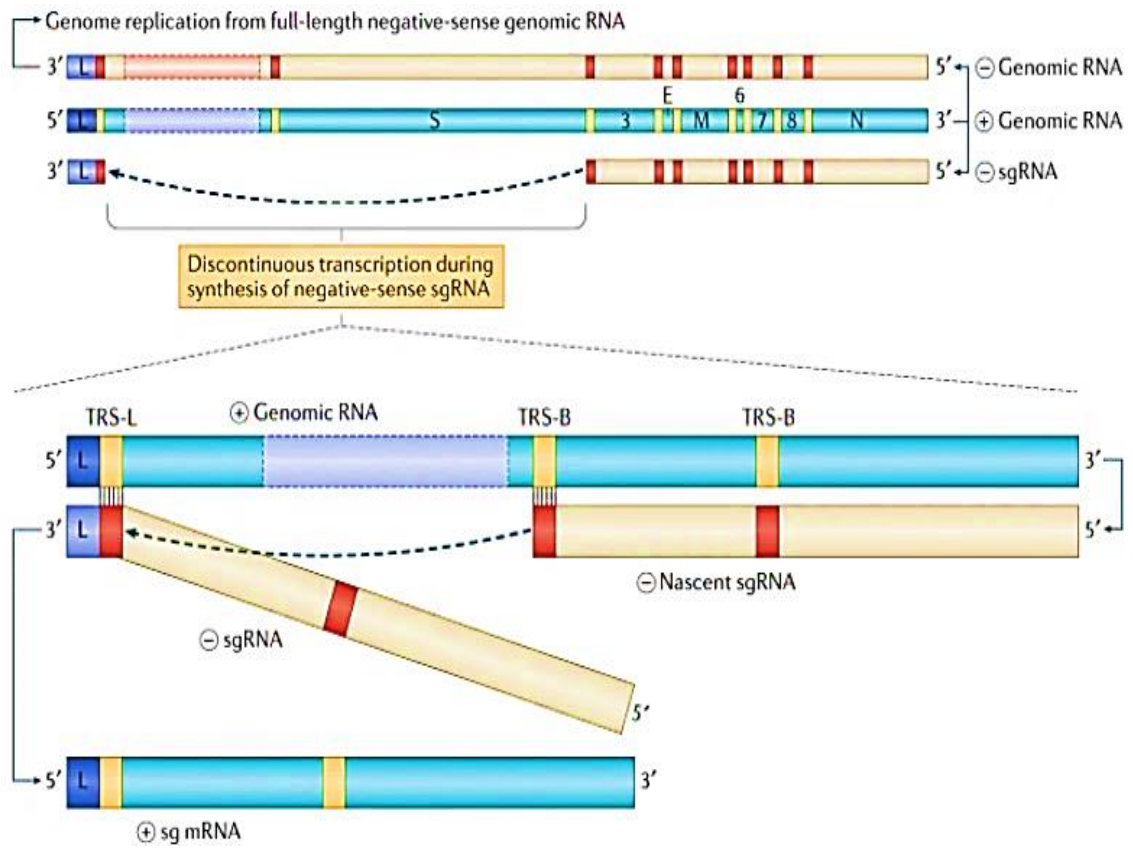


Figura 7. Replicación y transcripción del coronavirus

La síntesis de ARN negativo con un cambio de plantilla de secuencias reguladoras de la transcripción (TRS-B) a la TRS líder (TRS-L) para producir un ARNm subgenómico (V'kovski et al., 2021).

El ARN genómico y los ARNm de los diferentes ORFs estructurales, son utilizados en la traducción para sintetizar las proteínas estructurales del virus que son esenciales para el ensamblado viral. La proteína N interactúa con el ARN genómico para la formación de la nucleocápside en el citosol y las otras proteínas estructurales S, E y M se dirigen al retículo endoplasmático rugoso (RER) para poder traducirse e integrarse en la membrana del RER para seguir por la vía secretora, y de esta forma se produce el ensamblaje del virus, cuando las proteínas generadas se dirigen por la vía secretoria al retículo endoplasmático compartimento intermedio de Golgi (ERGIC), dónde se realiza el ensamblaje de los genomas virales encapsulados junto con las proteínas estructurales por medio de membranas producidas por el ERGIC, para producir viriones maduros (Fehr & Perlman, 2015).

Finalmente, luego del proceso de ensamblaje, los viriones se transportan a la superficie celular en vesículas y se liberan por medio de la exocitosis para que los viriones maduros puedan infectar a otras células sanas y se realice el ciclo celular del virus **(Figura 8)**.

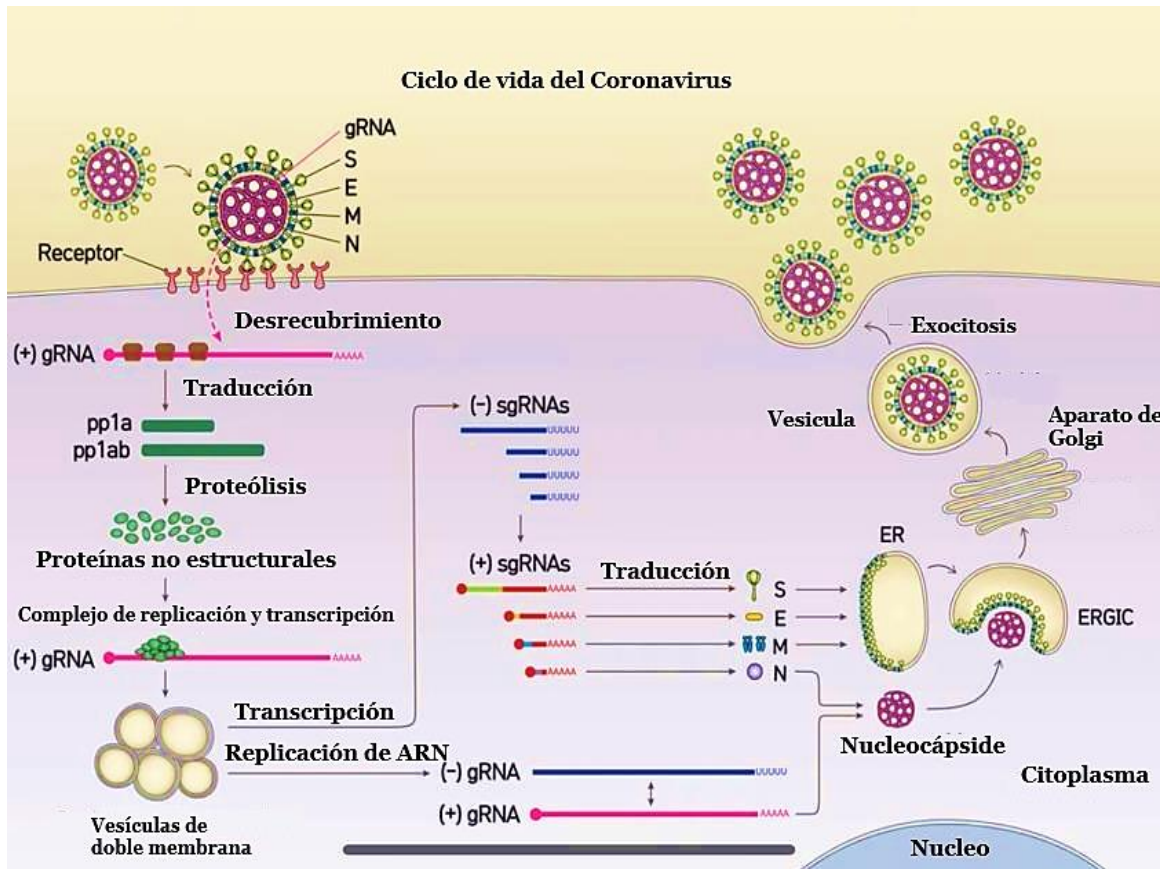


Figura 8. Ciclo de vida de los Coronavirus.

Unión y fusión del virión con la célula huésped, endocitosis, transcripción, replicación, ensamblaje y exocitosis de los viriones maduros (Waters, 2022).

2.2.4 Coronavirus y enfermedades infecciosas

Los coronavirus evolucionan rápidamente como resultado de la alta tasa de mutación, recombinación y capacidad de infectar diversas especies y tipos de células, causando brotes y enfermedades infecciosas en humanos y animales. Los coronavirus son causantes de enfermedades infecciosas en animales con afecciones desde enteritis en vacas, cerdos, enfermedades en el tracto respiratorio superior y renal en pollo y las infecciones respiratorias potencialmente letales en humanos (Wang et al., 2020). En la década de 1930 el coronavirus de animales con mayor relevancia fue el virus de la bronquitis infecciosa, fue uno de los primeros coronavirus aislados, procedentes de aves de corral. En la actualidad sigue siendo una de las enfermedades infecciosas que genera un gran problema económico a nivel mundial en las producciones comerciales aves de alta densidad (Payne, 2017). Los coronavirus humanos (HCoV) eran únicamente asociados con enfermedades leves del tracto respiratorio, capaces de causar “resfriados comunes” entre un 15% y 25% y fue hasta el año 2002 con el brote de SARS que estos virus comenzaron a evolucionar y tomar mayor virulencia a través de los años hasta la actualidad (Payne, 2017). La mayoría de los coronavirus animales y humanos se transmiten por vía fecal-oral infectando inicialmente las células epiteliales, el virus produce síntomas respiratorios o diarreas y algunos de ellos son causantes de enfermedades graves o mortales (Payne, 2017).

Los coronavirus animales causan infecciones graves en el ganado, cerdo, vacas, pollos, aves, perros y gatos (Wang et al., 2020). Los virus de la gastroenteritis transmisibles (TGEV) y el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) causan gastroenteritis en lechones, provocando una gran morbilidad, muerte y pérdidas económicas (Hasöksüz et al., 2020; Wang et al., 2020). El virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina

(PHEV) causa infecciones entéricas y afecta al sistema nervioso provocando encefalitis, vómitos y pérdida de peso (Y. Wang et al., 2020). El coronavirus FCoV causa infecciones en los gatos y puede presentar o no síntomas con una infección persistente, sin embargo como resultado de mutaciones se puede generar la cepa virulenta FIPV que causa la enfermedad letal llamada peritonitis infecciosa felina (PIF) (Y. Wang et al., 2020). El coronavirus bovino, de rata y el IBV causan infecciones del tracto respiratorio de leves a graves en ganado vacuno, ratas y pollos; causando pérdidas por la disminución en la producción en la industria ganadera, debido a las enfermedades respiratorias graves que provoca, junto con diarrea, deshidratación y pérdida de peso (Y. Wang et al., 2020; Q. Zhu et al., 2022). El coronavirus animal más estudiado es el virus de la hepatitis murina (MHV), es tomado como un modelo para estudiar los conceptos básicos de la replicación, patogénesis y respuesta inmune de los coronavirus. Este virus causa enfermedades respiratorias, entéricas, neurológicas y hepáticas que afectan gravemente a ratones (Y. Wang et al., 2020). Existe diferentes cepas de MHV, entre ellas se encuentra la MHV-1 que produce enfermedades respiratorias graves, la MHV-3 que produce hepatitis, ya que, induce lesión celular por medio de la activación de la cascada de coagulación por la vía dependiente de fgl2/fibroleucina y la JHMV causante de encefalitis y otras enfermedades agudas o crónicas (Hasöksüz et al., 2020; Y. Wang et al., 2020).

Los coronavirus humanos captaron la atención de la comunidad científica con la identificación de SARS-CoV, ya que, antes se creía que los coronavirus humanos solamente causaban infecciones respiratorias leves (Fehr & Perlman, 2015). En humanos se han identificado varios coronavirus entre los que se incluyen: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1. El HCoV-229E y HCoV-OC43 fueron aislados hace

casi 50 años, por el contrario, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 se identificaron después del brote de SARS-CoV (Y. Wang et al., 2020). HCoV-229E y HCoV-NL63 tienen su origen de un ancestro común y divergieron hace 200 años; en cambio el HCoV-OC43 se encuentra relacionado con el BCoV y por esta relación se puede transmitir de humanos a vacas (Y. Wang et al., 2020). Estos coronavirus mencionados son endémicos, son tolerantes a la variabilidad genética y causan infecciones del tracto respiratorio entre un 15% y 30% y afectan gravemente a neonatos, ancianos y personas que se encuentren inmunocomprometidas (Fehr & Perlman, 2015).

El SARS-CoV fue identificado en China en la provincia de Guangdong durante el brote del 2002-2003 y tiene una tasa de mortalidad cercana al 50% en personas mayores de 60 años (Y. Wang et al., 2020). Se conoce que el SARS-CoV se encuentra relacionado con los murciélagos, de estos se propagó a animales intermediarios y de ellos a los humanos (Y. Wang et al., 2020). El SARS-CoV infecta principalmente a las células epiteliales del pulmón, sin embargo, el virus puede entrar a través de los macrófagos y células dendríticas y producir una infección abortiva. Estas células inducen citocinas proinflamatorias y la respuesta reducida de las células T lo que contribuye con la enfermedad (Y. Wang et al., 2020). En el suero de los pacientes que tienen el virus se encuentran elevadas este tipo de células, por lo que se cree que la respuesta del huésped es responsable de gran parte de los signos y síntomas clínicos (Y. Wang et al., 2020).

En el 2012 surgió el MERS-CoV en el Medio Oriente, causante de infección en el tracto respiratorio altamente letal (Su et al., 2016). Hasta septiembre del 2019 este virus se estimaba con una tasa de letalidad de aproximadamente el 35% (Y. Wang et al., 2020). La

transmisión de MERS-CoV es por medio del contacto directo o indirecto de camellos, sin embargo, el reservorio natural es el murciélago, ya que se han identificado dos BtCoV (el *Tylonycteris* HKU4 y el *Pipistrellus* HKU5) relacionados con MERS-CoV, siendo una enfermedad de origen zoonótico (Y. Wang et al., 2020).

El SARS-CoV-2 fue identificado en el año 2019 en la ciudad Wuhan de la provincia Hubei en China, en un paciente que presentó neumonía atípica luego de visitar esta ciudad (Hasöksüz et al., 2020). Se identificó un 89% de nucleótidos relacionado con el coronavirus de murciélago (CoVZXC21) y en un 82% relacionado con el SARS-CoV, por esta razón se denomina SARS-CoV-2 (Hasöksüz et al., 2020). El SARS-CoV-2 puede transmitirse desde su reservorio natural a un huésped intermediario o de persona a persona y causar la infección de las células epiteliales del tracto respiratorio (Hasöksüz et al., 2020). Este virus ha tenido una evolución muy rápida debido a la cantidad de mutaciones que se generan en el genoma, provocando la aparición de nuevas variantes con una mayor y más rápida transmisibilidad y patogenicidad que las anteriores. Por lo tanto, es necesario vigilar la evolución viral del SARS-CoV-2 en huéspedes no humanos para el futuro de nuevas pandemias (Magateshvaren Saras et al., 2022).

2.3 Murciélagos como reservorios de virus

Los murciélagos son uno de los grupos más grandes de especies de mamíferos con la facilidad de moverse a largas distancias para luego permanecer en colonias, y son los huéspedes naturales de diversos tipos de virus (*lyssavirus*, *paramyxoviridae*, *coronaviridae* y *filoviridae*) (B. Hu et al., 2015; Montecino-Latorre et al., 2020). Se han aislado más de 60 coronavirus de murciélagos y la mayoría de ellos pertenecen al género

betacoronavirus. Los murciélagos son considerados reservorios naturales de algunos tipos de coronavirus (F. Lucero Arteaga, 2022; Payne, 2017; Wendong Li, 2005). Se cree que los principales huéspedes de los *alfacoronavirus* y *betacoronavirus* son los murciélagos, ya que desempeñan un papel importante como fuente de genes en la evolución dentro de estos dos géneros (B. Hu et al., 2015). El interés por estudiar los murciélagos como reservorios naturales de coronavirus, surge por los brotes de enfermedades de alto perfil: SARS-CoV, el MERS-CoV, el SARS-CoV-2, coronavirus del síndrome de diarrea aguda porcina (SADS-CoV) y el PEDV (Y. W. Huang et al., 2013; Joffrin et al., 2022; Montecino-Latorre et al., 2020).

El SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 son virus de origen zoonótico que tienen como reservorio natural el murciélago. El murciélago de herradura china (*Rhinolophus*) ha sido estudiado y se observa que tiene secuencias relacionadas con el SARS-CoV (Hasöksüz et al., 2020; B. Hu et al., 2015; MacLean et al., 2021; Y. Wang et al., 2020). Por otro lado, se ha estudiado el MERS-CoV y se encontró que filogenéticamente se encuentra relacionado con diversos coronavirus de diferentes especies de murciélagos en el mundo (B. Hu et al., 2015). Otro coronavirus de humanos relacionado con los murciélagos es HCoV-229E que fue asociado con el BtCoV, detectado en una especie de *Hipposideros caffer ruber* en Ghana y el fragmento del gen RdRp compartía una identidad del 92% con el CoV, esta evidencia indica que el HCoV-229E tiene un origen ancestral en los murciélagos (B. Hu et al., 2015). En el 2010 se realizó un estudio en el que se detectó una estrecha relación entre HCoV-NL63 y el coronavirus de murciélago (ARCoV) en un murciélago tricolor norteamericano *Perimyotis subflavus*, por lo tanto se alega que se originó en murciélagos (B. Hu et al., 2015).

Dentro de los coronavirus de animales que guardan relación con el murciélago y tienen como reservorio natural al murciélago, se encuentran: el PEDV y el coronavirus del síndrome de diarrea aguda porcina (SADS-CoV) (King, 2021; Zhang et al., 2021). El genoma del virus porcino SADS-CoV comparte 98% de identidad con el BtCoV del murciélagos de herradura china, pudiendo estos ser reservorios naturales de estos virus (King, 2021).

Un aspecto importante es la forma cómo se produce la infección viral en los murciélagos, ya que ocurre por medio de una infección viral estacional de acuerdo con la estructura poblacional del huésped y los ciclos de reproducción. Estos ciclos pueden encontrarse sincronizados para crear condiciones adecuadas para la transmisión viral entre huéspedes (Joffrin et al., 2022). El parto y la edad pueden ser factores importantes al momento de la transmisión de los CoV en los murciélagos, sin embargo, se necesita estudiar más a fondo debido a que los CoV asociados con los murciélagos pueden ser los responsables de futuros brotes en humanos y animales que afectan a la salud pública y a la producción industrial alimentaria (Joffrin et al., 2022). Un ejemplo de una especie de murciélagos que son huéspedes de CoV es el murciélago de cola libre *Mormopterus francoismoutoui* (RFTB). Esta especie de la Isla Reunión puede formar colonias de hasta 1000 individuos por metro cuadrado y es huésped de un *alfacoronavirus* (Joffrin et al., 2020, 2022) .

2.3.1 Casos documentados

Los coronavirus transmiten diversas enfermedades en animales y humanos. Los coronavirus animales pueden causar enfermedades respiratorias, neurológicas, entéricas y hepáticas graves en los huéspedes; por otro lado, los coronavirus humanos pueden afectar el tracto gastrointestinal y respiratorio (Poon, 2005). Cabe destacar que los coronavirus que causan enfermedades en humanos y animales, suelen no afectar a los huéspedes naturales (el murciélago) (Ruiz-Aravena et al., 2022).

Los contagios de coronavirus de murciélagos a humanos en los últimos años han aumentado provocando mayor zoonosis emergentes, esto se debe a que la cría y comercio de este tipo de animales facilita la transmisión de virus entre especies, la caza es otro factor que facilita el contacto con patógenos transmitidos por murciélagos (Ruiz-Aravena et al., 2022). No se tiene mucha información sobre si todas las especies de murciélagos tienen la capacidad para tolerar la infección por coronavirus, ya que, se sabe poco sobre la respuesta inmune de los murciélagos a las infecciones por coronavirus (Ruiz-Aravena et al., 2022). Sin embargo, en los murciélagos de herradura china (*Rhinolophus sinicus*) se han detectado coronavirus de murciélagos que se asemejan genéticamente al coronavirus SARS-CoV (Chu et al., 2020; Temmam et al., 2022; Wang et al., 2016). SARS-CoV y BtCoV están relacionados filogenéticamente y forman un clado bajo el subgénero *Sarbecovirus* (Chu et al., 2020). Se han identificado en estudios experimentales *Betacoronavirus*, que guardan relación con los coronavirus SARS-CoV y SARS-CoV-2 del subgénero *Sarbecovirus*, detectados en murciélagos *Rinolofidos* de África y Europa (Kettenburg et al., 2022). Además, se ha confirmado que el SARS-CoV-2 posee una similitud genética del 96,2%

con el coronavirus de murciélago RaTG13, sin embargo, el SARS-CoV solo posee 79% y el MERS-CoV 50% de similitud con el RaTG13 (Tang et al., 2020).

En reservorios naturales del virus se puede presentar tropismo en el tracto respiratorio y en el tracto gastrointestinal. En experimentos con murciélagos frugívoros jamaicanos se observó una alta carga de ARN de MERS-CoV en el tracto respiratorio y con menos carga viral en intestinos y otros órganos internos. Por otro lado, en un estudio con murciélagos *Rousettus Leschenaultii*, inoculados por vía oral con un *betacoronavirus*, se encontró ARN viral en los intestinos pero no se observó enfermedad, lo que sugiere que la especie no es competente para ese tipo de coronavirus (Ruiz-Aravena et al., 2022). Otro estudio con murciélagos egipcios inoculados de forma intranasal con el virus SARS-CoV-2, se observó infección respiratoria transitoria con carga viral alta en el tracto respiratorio en el cuarto día y la eliminación viral oral y fecal en el día 12 luego de la inoculación (Ruiz-Aravena et al., 2022). Con estos experimentos se pudo analizar el tropismo viral y la alta carga viral tanto en el sistema gastrointestinal y respiratorio de los murciélagos frugívoros como la presencia del virus en los intestinos de los murciélagos insectívoros (Ruiz-Aravena et al., 2022).

La prevalencia del coronavirus en murciélagos, estimada por la proporción de ARN viral detectado en heces o hisopados orales y fecales, presentan alta variabilidad temporal y espacial según estudios con dos o más eventos de muestreo con al menos diez muestras recolectadas y con información de positividad o negatividad de las muestras (Ruiz-Aravena et al., 2022). Se realizó un estudio con murciélagos en diferentes provincias del este de Tailandia entre el año 2008 y 2013 con un total de 626 murciélagos de 19 especies

diferentes, en este estudio la prevalencia de ARN de coronavirus detectada fue del 7.6% en 13 especies diferentes de murciélagos (Wacharapluesadee et al., 2015). En otro estudio realizado en 15 provincias de China, durante los años 2004 al 2006 con un total de 985 murciélagos de 35 especies, la prevalencia que se encontró fue del 6.5% con un total de 64 muestras positivas para coronavirus que se encontraron en 10 especies de las 35 (Tang et al., 2006). Se observó que la diseminación de coronavirus ocurre en verano u otoño en Australia y China, en estación seca en África central y Asia y en estaciones húmedas en África occidental; lo que nos lleva al análisis de que el mecanismo de transmisión de coronavirus en los murciélagos depende de la disponibilidad de recursos, ciclo reproductor, condiciones físicas, estaciones climáticas y según la especie de murciélago (Banerjee et al., 2020; Ruiz-Aravena et al., 2022).

Otro de los factores que pueden afectar la prevalencia del coronavirus es el tamaño, densidad y composición de las colonias de murciélagos; esto se debe a que la composición de las colonias afecta la circulación viral, ya que, regularmente distintas especies de murciélagos se encuentran juntas y la infección viral dependerá de las combinaciones de especies que existan en las colonias (Banerjee et al., 2020; Ruiz-Aravena et al., 2022). El tamaño y ubicación de los refugios afecta la posibilidad de propagación del virus entre especies, debido al estrecho contacto físico en refugios densos (Ruiz-Aravena et al., 2022; Willoughby et al., 2017).

Los ciclos reproductivos influyen en la transmisión y prevalencia del virus en colonias de murciélagos debido al comportamiento y susceptibilidad fisiológica que tiene el murciélago en este periodo, ya que por ejemplo, en especies que forman refugios

maternos, el tamaño del grupo aumenta en relación con el periodo de gestación y las respuestas inmunes inflamatorias se regulan negativamente, favoreciendo la infección viral en los murciélagos (Montecino-Latorre et al., 2022; Ruiz-Aravena et al., 2022). En un estudio se observó una alta prevalencia y concentración de coronavirus en murciélagos de herradura chinos *Rhinolophus sinicus* durante los meses de septiembre y octubre debido a un mayor número de juveniles susceptibles, por lo tanto es atribuible que las tasas de infección altas se encuentren relacionadas con la edad y susceptibilidad encontrada en los juveniles y subadultos (Ruiz-Aravena et al., 2022; M. N. Wang et al., 2016).

Las interacciones entre murciélagos y humanos no ocurren con regularidad, sin embargo en países de Oceanía, África, Asia, América del Sur y las islas del Pacífico utilizan distintas especies de murciélagos como alimento (Ruiz-Aravena et al., 2022). A largo plazo las interacciones murciélagos-humanos pueden traer infecciones virulentas en humanos y, en los murciélagos la salud puede afectarse como consecuencia del cambio de la calidad de su hábitat debido al cambio climático, disponibilidad de alimentos y deforestación alterando la relación hospedero-huésped (Ruiz-Aravena et al., 2022; Rulli et al., 2021). Otro factor es el comercio ilegal y legal de vida silvestre que permite que los virus sean transportados a largas distancias en sus huéspedes naturales lo que aumenta la dispersión del virus. Sin embargo, hay pocos casos documentados de infecciones directas murciélago-humano debido probablemente a la falta de vigilancia (Ruiz-Aravena et al., 2022). Las infecciones por los coronavirus de murciélagos enfrentan numerosas barreras que impiden la transmisión o infección por distintas razones: falta de contacto entre el BtCoV y humanos o el virus no se puede transferir eficientemente en el humano (Ruiz-Aravena et al., 2022). Estudios previos sugieren que los coronavirus que guardan relación con los murciélagos y

que pueden infectar a humanos directamente tienen una prevalencia menor del 3% y no se propagan eficientemente en humanos (Ruiz-Aravena et al., 2022). Se sugiere que es necesario mejorar el diagnóstico molecular y serológico para poder comprender mejor cómo, dónde y cuándo se producen los contagios por coronavirus en los humanos.

2.3.2 Coronavirus en murciélagos

Los murciélagos son el segundo orden más grande de mamíferos y representan una quinta parte de todas las especies de mamíferos distribuidos en el mundo (Fan et al., 2019). Están clasificados en el orden *Chiroptera* y en dos grandes subórdenes: *Yinpterochiroptera* y *Yangochiroptera* (Fan et al., 2019; Wong et al., 2019). *Yinpterochiroptera* se conforma de una familia *Pteropodidae* (megabat) y cinco familias *Rhinolophoidea* (microbat), *Yangochiroptera* se conforma de 13 familias (microbat) (Fan et al., 2019).

En los murciélagos solamente se han encontrado coronavirus pertenecientes a dos géneros: el Alfacoronavirus y el Betacoronavirus (Wong et al., 2019). Dentro del género Betacoronavirus se han encontrado coronavirus en murciélagos en los subgéneros Sarbecovirus (los coronavirus relacionados con SARS), Merbecovirus (Ty-BatCoV HKU4, Pi-BatCoV HKU5, Hp-BatCoV HKU25, CoV relacionados con el MERS), Nobecovirus (Ro-BatCoV HKU9 y Ro-BatCoV GCCDC1) y también en Hibecovirus (Bat Hp-betaCoV Zhejiang 2013)(Wong et al., 2019). En un estudio realizado con 112 murciélagos en la provincia Hainan en China, se identificaron tres coronavirus, del género Betacoronavirus (BatCoV CD35, BatCoV CD36) y del género Alfacoronavirus el CD30; BatCoV CD35 se asemeja en un 99.5% con BatCoV CD36 y ambos se asemejaban en un 71.4% con el Bat Hp-betaCoV Zhejiang 2013 y en un 54% de identidad con el

SARS-CoV-2 (W. Zhu et al., 2023). En el 2013 se detectó en la provincia de Yunnan en China, el coronavirus del subgénero *Sarbecovirus* RaTG13, que fue identificado en un murciélago de herradura chino *Rhinolophus Affinis*, estos murciélagos son reservorios de coronavirus similares al SARS (Galindo-González, 2022). El BtCoV RaTG13 guarda una similitud con el SARS-CoV-2 del 96%, sin embargo, el RaTG13 no puede ingresar a las células humanas, debido a que la unión con el receptor de la proteína S del virus, no es compatible con los receptores de membrana celular humana (ACE2) (Galindo-González, 2022). Los coronavirus del género Alfacoronavirus y el Betacoronavirus se han detectado en murciélagos de Asia, Europa, África, América del Norte y del Sur y Australasia (Wong et al., 2019). El género Alfacoronavirus tiene una tasa de detección mayor que el Betacoronavirus y se encuentra más extendido geográficamente (**Figura 9**) (Wong et al., 2019). Existe la idea de que la diversidad de especies de murciélagos junto con sus formas de vida, pueden contribuir con la epidemiología de los CoV, ya que, de acuerdo con los brotes de CoV por regiones geográficas y por las especies de murciélagos se puede deducir la distribución de las poblaciones de acuerdo con sus respectivos murciélagos huéspedes (Wong et al., 2019).

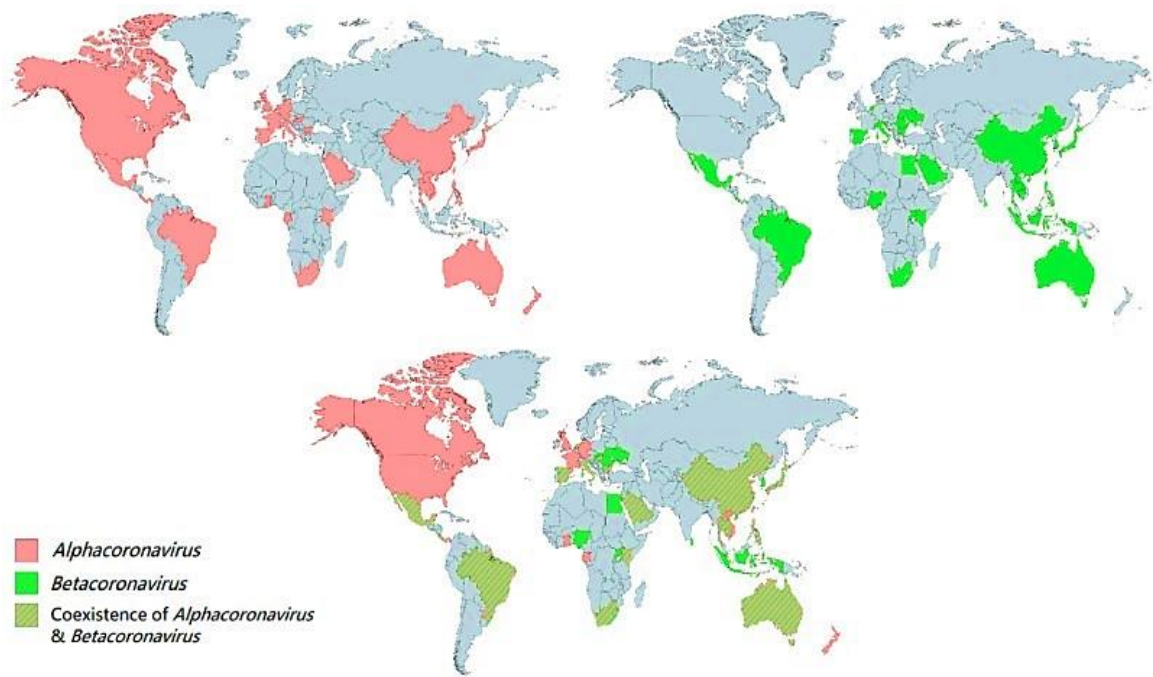


Figura 9. Distribución geográfica de los BtCoV de los géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*.

Las regiones rojas representan los países donde se han descubrieron los *Alfacoronavirus* de murciélagos, las regiones verdes representan los países que descubrieron el *Betacoronavirus* de los murciélagos y las regiones con rayas rojas y verdes representan los países que descubrieron *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus* en murciélagos (Wong et al., 2019).

El interés por la identificación de los BtCoV se inicia con la aparición de SARS-CoV (*Sarbecovirus*), MERS-CoV (*Merbecovirus*) y otros coronavirus relacionados, debido a que son probables ancestros de SARS-CoV, MERS-CoV y de otros tipos de CoV. En los últimos años se han identificado nuevos BtCoV, como el HKU2; el coronavirus del síndrome de diarrea aguda porcina (SADS-CoV), el TGEV y PED en cerdos (Y. Wang et al., 2020).

El SADS-CoV (*Rhinacovirus*) causante del brote de enfermedad porcina fetal y el SARS-CoV se descubrieron en murciélagos de herradura chinos (*Rhinolophus sinicus* y *Rhinolophus affinis*) (Wong et al., 2019). Por otro lado, en murciélagos frugívoro del sur de Asia, de especie *Rousettus leschenaultia* se encuentran los Nobecovirus Ro-BatCoV HKU9 y Ro-BatCoVGCCDC1 (Wong et al., 2019).

2.4 Métodos de detección de coronavirus en murciélagos

El diagnóstico del BtCoV y otros CoVs es necesario en programas de vigilancia en salud pública como estrategia de control de brotes graves de este tipo de virus como también de enfermedades en animales como, las producidas por PEDV y IBV. Dentro de los principales métodos de diagnóstico se encuentran las técnicas moleculares como la prueba estándar de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real (RT-PCR) que es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las pruebas serológicas (Y. Wang et al., 2020). La tasa de detección en los murciélagos es mayor en muestras intestinales y fecales, a diferencia de las muestras de garganta u orina con una tasa de detección más baja para los coronavirus de los géneros

Alfacoronavirus y el *Betacoronavirus* , de los 4 géneros que existen (Watanabe et al., 2010; Wong et al., 2019).

2.4.1 Inmunológicos

Las pruebas serológicas con anticuerpos para la detección de distintos tipos de CoV, se emplean cuando no es posible extraer o aislar el ARN viral y para estudios en epidemiología, son pruebas rápidas y eficientes (Y. Wang et al., 2020). Se emplean pruebas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), pruebas de Western Blot (WB) y las pruebas de inmunoensayo enzimático (EIA) (Banerjee, 2018; Stockman LJ, 2008).

La prueba ELISA utiliza anticuerpos ligados a enzimas que ayudan a detectar concentraciones del antígeno de interés en el suero, se utiliza una superficie para que los anticuerpos se adhieran y con la presencia del antígeno se produce una reacción enzimática que causa un cambio de color para dictaminar la presencia del antígeno de interés (Engvall E & Perlmann P, 1971). Se ha detectado FCoV mediante el uso de ELISA de tipo indirecta, donde se detectan anticuerpos contra el FCoV utilizando proteínas S recombinantes marcadas con histidina. El análisis de la curva de características operativas del receptor mostró una sensibilidad del 86% y especificidad del 93.3%, concluyendo que este tipo de ensayo se puede utilizar para medir anticuerpos séricos contra el FCoV (Dong et al., 2021).

La prueba de Western Blot se utiliza para detectar una proteína específica en una muestra de sangre o tejido, mediante el uso de electroforesis en gel para la separación de proteína-muestra. La proteína se transfiere del gel a la superficie de una membrana para que un anticuerpo específico se exponga contra la proteína de estudio, el anticuerpo se

detecta usando un marcador radioactivo o mediante una reacción de color (Burnette', 1981; Towbin et al., 1979). En un estudio realizado en ratones para determinar la infectividad de un BtCoV, se utilizó la prueba de WB, donde se utilizó seis fuentes diferentes de proteína N del coronavirus de murciélago SL-CoV-ZC45, teniendo como resultado que los antígenos polipeptídicos se sintetizaron correctamente y los anticuerpos policlonales producidos contra el polipéptido reaccionaron con las proteínas N del SL-CoV-ZC45 (D. Hu et al., 2018).

Las pruebas EIA utilizan un anticuerpo que detecta el antígeno de interés que está marcado con una enzima indicadora que permite detectar cantidades muy pequeñas del antígeno (Yalow & Berson, 1960). Para la detección de anticuerpos específicos para el SARS-CoV-2, se realizó un estudio para evaluar los anticuerpos neutralizantes en relación con los índices de señal de distintas pruebas de EIA de distintos distribuidores comerciales (Cobas Elecsys Anti-SARS-CoV-2, Vitros Immunodiagnostic Anti-SARS-CoV-2, Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG). El rendimiento de las pruebas se evaluó de acuerdo con su sensibilidad y especificidad y se observó que las pruebas más sensibles fueron: Cobas Elecsys Anti-SARS-CoV-2 con el 98% y Vitros Immunodiagnostic Anti-SARS-CoV-2 con el 100% detectando anticuerpos totales dirigidos a los antígenos N y S1 del SARS-CoV-2. En conclusión, este tipo de pruebas tienen un potencial para el uso clínico y en el área de la investigación en la evaluación de la protección después de la infección o vacunación y el uso como prueba sustituta si no se pueden realizar pruebas de biología molecular (Walker et al., 2021).

2.4.3 PCR en tiempo real

La RT-PCR es el método más elegido para el diagnóstico del CoV. RT-PCR múltiples en tiempo real, como RT-RTPA y RT-LAMP son capaces de detectar nuevos CoV y los ya existentes en humanos (Y. Wang et al., 2020).

La RT-PCR es la prueba recomendada por la OMS para la detección en primera línea para identificar el SARS-CoV-2, se basa en un aumento exponencial de las copias de ADN, esto se ve reflejado por la aparición de fluorescencia con intensidad directamente proporcional a la cantidad de ARN que se detecta en la muestra, teniendo como resultado una reacción altamente sensible aun con bajas concentraciones de los ácidos nucleicos del virus (Abbasi et al., 2022; Cuadra et al., 2021; Truong et al., 2021). Se incluyen genes de coronavirus para la detección como: ORF1 (representados en secciones a y b), N, M, E, S y el RdRp. Se han seleccionado estos genes debido a que son regiones persistentes en los CoV y que cada uno de ellos tiene una sensibilidad y especificidad diferente (Abbasi et al., 2022; Cuadra et al., 2021). En un estudio utilizando la PCR en tiempo real con “primers” de los genes E y RdRp para la identificación del SARS-CoV-2, se evidencio que el “primer” del gen N tiene una mayor especificidad en comparación con el utilizado para el gen RdRp y que los resultados en la qPCR pueden verse afectados por factores como: los “primers” o sondas que se eligen, la cantidad de muestra o carga viral, el tipo y calidad de muestra y el momento de la toma de muestra; resaltando que el uso de sondas o “primers” es la principal causa de obtener falsos negativos y recomienda utilizar un conjunto de sondas múltiples con diferente sensibilidad y especificidad para evitar resultados falsos negativos (Abbasi et al., 2022).

METODOLOGÍA

Capítulo III

Metodología

3.1 Sitios de colecta

Las muestras se colectaron en 12 sitios de la República de Panamá. Las provincias donde se tomaron las muestras durante el estudio fueron: Panamá, Coclé, Darién, Comarca Ngäbe-Buglé, Chiriquí y Veraguas (**Figura 10**).

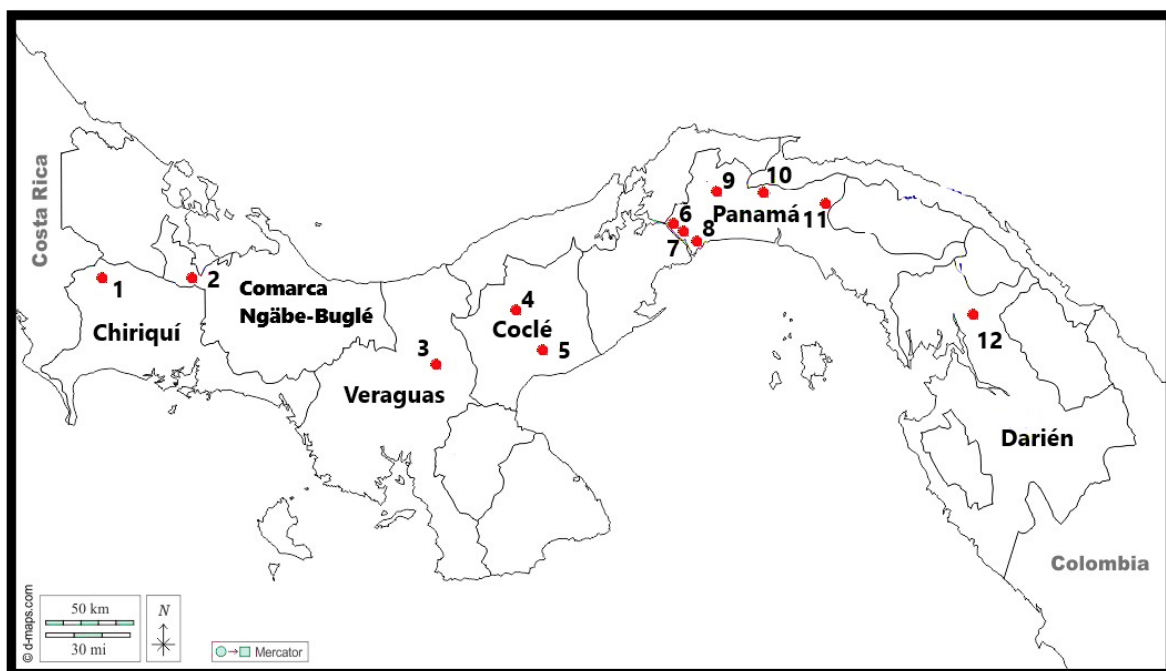


Figura 10. Sitios del área de estudio.

En la imagen se indican los 12 sitios del área de estudio, se encuentran enumerados y señalados con un punto rojo en las 6 provincias. La ubicación específica para cada punto fue la siguiente: 1- Mount Totumas Cloud Forest- Provincia de Chiriquí, 2- Fortuna Cabins-Comarca Ngäbe-Buglé, 3- Calobre-Provincia de Veraguas, 4- La Saldaña- Provincia de Coclé, 5- Centro Regional Universitario de Coclé- Provincia de Coclé, 6- Parque Nacional Soberanía-Provincia de Panamá, 7- Summit rainforest & golf resort-Provincia de Panamá, 8- Parque Natural Metropolitano- Provincia de Panamá, 9- Cerro Azul- Provincia de Panamá, 10- Valle de Mamoní- Provincia de Panamá, 11- Reserva Privada Bunorgándi- Provincia de Panamá y 12- Centro Regional Universitario de Darién- Provincia de Darién.

3.2 Colecta de muestras

La captura de murciélagos se realizó utilizando una red de niebla, las cuales se colocaron en los sitios seleccionados a una altura de 2 a 3 metros del nivel del suelo. Los especímenes capturados fueron liberados de la red y colocados en bolsas de algodón por unos minutos con la finalidad de tranquilizarlos. Se determinó para cada espécimen la especie, el sexo, longitud del antebrazo, peso y etapa de madurez (juvenil o adulto). Generalmente, los murciélagos capturados excretaron material fecal que fue colectado de las bolsas con hisopos estériles. En especímenes que no excretaron material fecal en las bolsas de algodón se procedió a obtener la muestra mediante hisopado rectal (**Figura 11**).



Figura 11. Proceso de colecta de muestras.

A. Instalación de redes de niebla en la zona de captura, B. Espécimen capturado y proceso de toma de datos (especie, el sexo, longitud del antebrazo, peso y etapa de madurez), C. Toma de muestras de heces mediante hisopado rectal.

Se colectaron un total de 217 muestras de heces y se colocaron en medio de transporte “PrimeStore MTM Transport Medium for Nucleic Acid Testing” (Longhorn vaccines and diagnostic, LLCMD, USA). Este medio de transporte, inactiva, estabiliza y preserva el ARN de las muestras colectadas. Una vez obtenidas las muestras, los especímenes fueron marcados con un collar de acuerdo con su tamaño y edad con el objeto de no obtener dos veces muestras del mismo espécimen. Las muestras se transportaron al laboratorio para sus posteriores análisis.

3.3 Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Los tubos con medio de transporte que contenía las muestras fueron agitados brevemente con un vortex con la finalidad de obtener una suspensión homogénea. El hisopo fue retirado del medio y un volumen de 280 µl de la suspensión fue utilizado en la extracción de ARN. La extracción se realizó con el kit comercial QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Valencia, California, USA) de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante.

Debido a que no se disponía de una muestra de heces de murciélagos positiva para coronavirus, que debería utilizarse como control positivo para la extracción de ARN, la síntesis de cDNA y el PCR; se utilizó como control positivo hojas de cítricos infectas con el virus de la tristeza de los cítricos (CTV). El CTV al igual que coronavirus, es un virus de cadena simple de ARN de sentido positivo con un genoma de gran tamaño (19.3 kb), al igual que coronavirus (Folimonova, 2020). La validación del procedimiento de extracción se comprueba con la obtención del ARN de la planta y el ARN del virus de la tristeza de los cítricos. El ARN de las hojas de cítricos infectadas con CTV se extrajo utilizando

exactamente el mismo procedimiento para la extracción de ARN a partir de las muestras de heces de murciélagos. Luego de la extracción, las muestras fueron almacenadas a -80°C para posteriormente ser utilizadas en la síntesis de cDNA.

La síntesis del cDNA se realizó a partir de $10\ \mu\text{l}$ de ARN utilizando el kit comercial ProtoScript II Reverse Transcriptase y Random primers 6 de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante (New England Biolabs, Massachusetts, USA). Las condiciones de temperatura empleadas en la síntesis del cDNA fueron: 65°C 5 min, 25°C 5 min, 42°C 60 min y 65°C por 20 minutos (Camille Lebarbenchon, Beza Ramasindrazana, Léa Joffrin, Sandra Bos, Erwan Lagadec, Gildas Le Minter, Yann Gomard, Pablo Tortosa, David A Wilkinson, 2017). El volumen final de reacción fue de $20\ \mu\text{l}$. El cDNA fue almacenado a -80°C para su posterior uso en las reacciones de amplificación.

3.4 PCR punto final

El cDNA fue utilizado para determinar la presencia del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) presente en los coronavirus (Corman et al., 2020). La presencia del gen RdRp fue evaluada mediante PCR punto final utilizando “primers” específicos para amplificar una región de 440 pares de bases (pb) del gen RdRp (Poon, 2005). La secuencia de los “primers” utilizados para amplificar una región de 440 pb del gen RdRp se observan en el **(Cuadro 5)**.

En la reacción de PCR se utilizaron $5\ \mu\text{l}$ de cDNA de los controles y las muestras incluyendo el control negativo, $1\ \mu\text{l}$ de cada “primer”, $12.5\ \mu\text{l}$ de enzima Go taq® G2 Hot Start Green Máster Mix (Promega, Madison, USA) y $5.5\ \mu\text{l}$ de H_2O libre de nucleasas para

un volumen final 25 µl por reacción. Las condiciones de la amplificación fueron: 95°C 2min, 45 ciclos a 95°C 1min, 54°C 1 min, 72°C 1 min, y una extensión final a 72°C de 10 min.

Cuadro 5. Secuencia de los “primers” IN6 y IN7 que amplifican una región de 440 pb del gen RdRp de coronavirus de murciélagos.

PCR punto	Gen	Orientación del "primer"	Secuencia de nucleótidos
final	RdRp	IN 6 Forward	5'-GGT TGG GAC TAT CCT AAG TGT GA-3'
		IN 7 Reverse	5'-CCA TCA TCA GAT AGA ATC ATC ATA-3'

Con el propósito de amplificar muestras que pudieran presentar secuencias que difieran un tanto con las secuencias a las que se une con el “primer” específico. Se realizó una PCR anidada (Nested PCR), en el cual se utilizaron “primers” degenerados (**Cuadro 6**) (Quan et al., 2010). En la primera PCR se utilizó un “pool” de 11 muestras de cDNA. De cada muestra de cDNA se utilizó 1 µl para un total de 11 µl de cDNA. Se utilizó 1 µl de cada “primer”, 15 µl de la enzima polimerasa Go taq® G2 Hot Start Green Máster Mix (Promega, Madison, USA) y 2 µl de agua libre de nucleasas en un volumen final de 30 µl. Las condiciones de la amplificación para la primera PCR fueron: 1 ciclo a 95°C durante 15 min; 15 ciclos a 95°C durante 30 s, 65°C durante 30 s (-1°C/ciclo) y 72°C durante 45 s.

En la segunda PCR se utilizaron 4 μ l de la primera PCR, 1 μ l de cada “primer”, 12.5 μ l de enzima polimerasa Go taq® G2 Hot Start Green Máster Mix (Promega, Madison, USA) y 6.5 μ l de agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de amplificación en esta PCR fueron: 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 50°C por 30 s y 72°C por 45 s; y 1 ciclo a 72°C durante 5 min.

Cuadro 6. Secuencia de los “primers” degenerados del gen RdRp para Nested PCR.

	Gen	Orientación del "primer"	Secuencia de nucleótidos
Nested PCR 1	RdRp	Nest 1 Forward	5'-CGT TGG IAC WAA YBT VCC WYT ICA RBT RGG-3'
		Nest 1 Reverse	5'-GGT CAT KAT AGC RTC AVM ASW GCN ACN ACA TG-3'
Nest 2 Forward		5'-GGC WCC WCC HGG NGA RCA ATT-3'	
Nest 2 Reverse		5'-GGW AWC CCC AYT GYT GWA YRT C-3'	
Nested PCR 2			

Leyenda: W (A/T), B (C/G/T), V (A/C/G), N (A/C/G/T), Y (C/T), I (Inosina), R (A/G). M(A/C) y H (A/C/T).

Se utilizaron controles de amplificación (para cada PCR) positivos y negativos. Como control positivo de amplificación se utilizó cDNA de SARS-CoV-2 proporcionado por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) (**Cuadro 7**). Además, también se utilizó como control positivo de amplificación el cDNA generado a partir del ARN de hojas de cítricos infectadas con CTV. Se utilizaron “primers” específicos para amplificar una región de 150 pb del gen E “Envelope” de SARS-CoV-2 mientras que

los “primers” utilizados para CTV amplifican una región de 655 pb de la proteína de la cubierta (CP)(Hung, T et al., 2000). En el caso del cDNA generado a partir de las hojas infectadas se utilizó como control interno de extracción y síntesis de cDNA el gen mitocondrial de la subunidad 5 de NADH (Nad5) presente en plantas. Se utilizó como control negativo de amplificación una muestra de agua (libre de nucleasas) procesada de la misma manera que las muestras colectadas desde la extracción ARN hasta la síntesis de cDNA. Las condiciones de amplificación mediante PCR utilizando los “primer” Nad5 y el de CTV fueron: 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 1 min y 72°C durante 5 min.

Cuadro 7. Secuencias de “primers” utilizados como controles.

	Orientación del "primer"	Secuencia de nucleótidos
SARS-CoV-2	E_Sarbeco Forward	5'-ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT-3'
	E_Sarbeco Reverse	5'-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A-3'
	N Forward N Reverse	5'-TAA TCA GAC AAG GAA CTG ATT A-3' 5'-CGA AGG TGT GAC TTC CAT G-3'
Nad5	nad5-F	5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3'
	nad-R	5'- CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3'
CTV	655 Forward	5'-TTA TGG ACG ACG AGA CAA AGA-3'
	655 Reverse	5'-CCA AGC TGC CTG ACA TTA GT-3'

3.5 Electroforesis

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en “buffer” TAE 1X con 2 μ l de Gel Red para evidenciar la presencia o no de productos de amplificación de aproximadamente 440 pb, indicativos de la amplificación de una región de gen RdRp y por lo tanto de la presencia de coronavirus. Se cargó en cada gel 0.5 μ l del marcador de peso molecular HyperLadder™100pb (Bioline, Tennessee, USA) y 2 μ l de cada muestra.

RESULTADOS

Capítulo IV

Resultados

4.1 Extracción de ARN y Síntesis de cDNA

Se logró la extracción de ácidos nucleicos incluyendo ARN, la cual fue evidenciada mediante espectrofotometría. La relación 260/280 fue mayor de 2.0 en todas las 217 muestras analizadas. Una relación 260/280 alrededor de 2.0 es generalmente aceptada como ARN de buena calidad (Wilfinger W et al., 1997).

4.2 Control de Extracción de ARN y Síntesis de cDNA

Debido a que la absorbancia no es un método confiable para evaluar la calidad del cDNA ya que no discrimina entre ADN total, ARN, oligonucleótidos y dNTPs que generalmente, están presentes en las preparaciones de cDNA, se procedió a evaluar indirectamente la calidad tanto del ARN como la del cDNA mediante la amplificación de productos generados a partir de este. La electroforesis de los productos de amplificación generados a partir del cDNA que se obtuvo de las hojas de cítricos infectadas con CTV muestran dos tipos de productos de amplificación; una banda de 600 bp y otra de 300 bp (**Figura 12**). La banda de 600 bp corresponde a la amplificación de la proteína de la cubierta (cápside) del CTV mientras que el producto de 300 bp corresponde a la amplificación de una región del gen mitocondrial de la reductasa de NADH-ubiquinona (Nad5) presente en plantas y utilizado como control interno. Estos resultados indican que el kit y el procedimiento de extracción de ARN utilizado permitió la obtención de ARN de la planta y ARN viral (CTV) y que a partir de estos ARN se logró la síntesis de cDNA de la planta y del virus los cuales sirvieron de templado para la amplificación de los productos

antes mencionados. Los carriles CTV1 y CTV2 corresponden al PCR en donde sólo se utilizó “primers” específicos para la amplificación de la proteína de la cubierta del virus; mientras que los carriles CTVM1 y CTVM2 corresponden a los productos de PCR en los cuales se utilizaron los dos pares de “primers”; es decir “primers” para la amplificación de la proteína de la cubierta y cebadores para la amplificación del control interno de la planta (Nad5). En ambos carriles (CTVM1 y CTVM2) se observan los dos productos de amplificación esperados (300 bp y 600 bp). Es importante mencionar que las hojas de cítricos fueron procesadas de la misma manera que las muestras de heces incluyendo la utilización del medio de transporte.

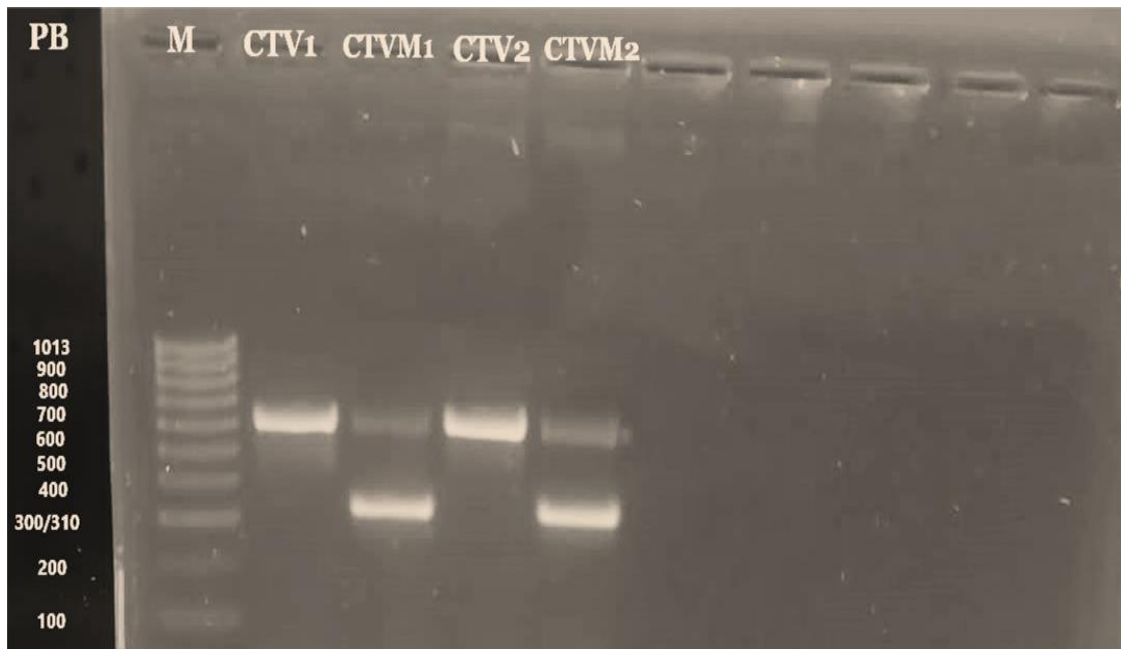


Figura 12. Productos de amplificación a partir del cDNA de hojas de cítricos infectas con CTV.

Leyenda: PB, pares de bases; M, marcador de peso molecular; CTV1 y CTV2, producto de amplificación de la proteína de la cubierta del CTV; CTVM1 y CTVM2 producto de amplificación de la proteína de la cubierta de CTV y del gen Nad5 de cítricos.

Adicionalmente, se utilizó como control positivo de amplificación, el cDNA de una muestra positiva para SARS CoV-2 proporcionada por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Ciencias de la Salud (ICGES). Este cDNA fue utilizado para amplificar una región del gen que codifica para la proteína de la envoltura (E) y una región que codifica para la proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV2.

Los resultados de la amplificación a partir de este cDNA (control positivo) con “primers” para la amplificación de RdRp de murciélagos (IN6/7), una región del gen de la envoltura y una región del gen de la nucleocápside de SARS-CoV2 con cebadores específicos y la amplificación del cDNA de tres muestras (001, 002 y 003) de murciélagos con “primers” IN6/7 se muestran en la (**Figura 13**). El carril IN6/7, corresponde a la amplificación del cDNA con los “primers” IN6, IN7 específicos para la amplificación de RdRp de coronavirus de murciélagos. En este carril no se observó amplificación. Los cebadores IN6 e IN7 son específicos para la amplificación de RdRp de coronavirus de murciélagos lo cual explica la ausencia de un producto de amplificación. Además, comprobamos que en efecto estos cebadores no anidan con RdRp de SARS-CoV2 al realizar una comparación de la secuencia de los estos “primers” con las secuencias depositadas en Genbank utilizando BLAST ®, de la plataforma del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En los carriles E y N se observan los productos de amplificación de 112 pb que corresponde a una región del gen de la envoltura (E) y de 109 pb que corresponde a una región del gen de la nucleocápside (N) de SARS-CoV-2, amplificado con los “primers” específicos. Los carriles 001, 002, y 003 corresponden a muestras de cDNA generadas a partir de muestras de heces colectadas en este estudio y en las cuales se utilizó en el PCR “primers” IN6/7.

La ausencia de productos de amplificación de 440 pb en estos carriles (001, 002 y 003) indican resultados negativos para la detección del gen de la RdRp de coronavirus de murciélagos y por lo tanto pueden ser indicativos de la ausencia del virus.



Figura 13. PCR de Controles y muestras.

PB, pares de bases; M, marcador de peso molecular; IN6/7, E y N, cDNAs de SARS-CoV2 amplificado con “primers” IN6/7, E y N respectivamente; 001, 002 y 003 cDNAs de muestras de heces de murciélagos amplificadas con IN6/7.

4.3 PCR de las muestras analizadas

Se analizaron 217 muestras de heces de murciélagos de 48 especies diferentes (**Cuadro 8**). Las especies con mayor cantidad de muestras analizadas fueron *Artibeus Jamaicensis* (56/217), *Carollia perspicillata* (30/217) y *Uroderma Convexum* (11/217), *Carollia castanea* (9/217) y *Artibeus intermedius* (8/217). Veinticinco (25) de las cuarenta y ocho (48) especies; es decir el 52 % y el resto de las especies por 2 a 6 muestras.

No se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las 217 muestras analizadas ni con “primers” específicos ni con “primers” degenerados para la amplificación de una región de la RdRp de coronavirus de murciélagos (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Muestras analizadas por especies, sitios de colecta y resultados.

Especie	Sitio de colecta	Cantidad	Resultado	
			PCR punto final	PCR anidada
<i>Anoura geoffroyi</i>	1	5	Negativo	Negativo
<i>Artibeus intermedius</i>	10,5	8	Negativo	Negativo
<i>Artibeus jamaicensis</i>	2, 3,4,5,6,7,8,9,10, 11,12	56	Negativo	Negativo
<i>Artibeus lituratus</i>	3,5,6,8,10,11	8	Negativo	Negativo
<i>Artibeus phaeotis</i>	10	2	Negativo	Negativo
<i>Artibeus sp.</i>	1	1	Negativo	Negativo
<i>Artibeus toltecus</i>	2	4	Negativo	Negativo
<i>Artibeus watsoni</i>	2,10	4	Negativo	Negativo
<i>Carollia brevicauda</i>	1, 10	2	Negativo	Negativo
<i>Carollia castanea</i>	2,6,8,9,10,11	11	Negativo	Negativo
<i>Carollia perspicillata</i>	2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12	30	Negativo	Negativo
<i>Carollia sp.</i>	2	1	Negativo	Negativo
<i>Chiroderma trinitatum</i>	10	1	Negativo	Negativo
<i>Dermanura Sp.</i>	2	1	Negativo	Negativo
<i>Desmodus rotundus</i>	5, 10	3	Negativo	Negativo
<i>Enchisthenes hartii</i>	2	1	Negativo	Negativo
<i>Gardnerycteris keenani</i>	7,10	3	Negativo	Negativo
<i>Glossophaga commissarisi</i>	3	1	Negativo	Negativo
<i>Glossophaga soricina</i>	5,7	4	Negativo	Negativo
<i>Glossophaga sp.</i>	11	1	Negativo	Negativo
<i>Glossophaginae</i>	2	1	Negativo	Negativo
<i>Hsunycteris thomasi</i>	2	1	Negativo	Negativo
<i>Lasiurus ega</i>	10	1	Negativo	Negativo
<i>Lichonycteris obscura</i>	10	1	Negativo	Negativo
<i>Lonchophylla concava</i>	10	1	Negativo	Negativo

<i>Lophostoma brasiliense</i>	11	1	Negativo	Negativo
<i>Lophostoma silvicolum</i>	9	1	Negativo	Negativo
<i>Micronycteris hirsuta</i>	6	1	Negativo	Negativo
<i>Micronycteris microtis</i>	2	1	Negativo	Negativo
<i>Myotis riparius</i>	1	1	Negativo	Negativo
<i>Myotis sp.</i>	10	2	Negativo	Negativo
<i>Noctilio leporinus</i>	6	6	Negativo	Negativo
<i>Phyllostomus discolor</i>	4	2	Negativo	Negativo
<i>Platyrrhinus helleri</i>	10	3	Negativo	Negativo
<i>Pteronotus mesoamericanus</i>	7	1	Negativo	Negativo
<i>Pteronotus personatus</i>	11	1	Negativo	Negativo
<i>Saccopteryx bilineata</i>	10	1	Negativo	Negativo
<i>Sturnira burtonlimi</i>	1	5	Negativo	Negativo
<i>Sturnira hondurensis</i>	1	2	Negativo	Negativo
<i>Sturnira lilium</i>	1	1	Negativo	Negativo
<i>Sturnira mordax</i>	1	5	Negativo	Negativo
<i>Sturnira sp.</i>	1, 2, 4	6	Negativo	Negativo
<i>Uroderma convexum</i>	3, 7, 8, 10,11	11	Negativo	Negativo
<i>Uroderma magnirostrum</i>	10	1	Negativo	Negativo
<i>Vampyressa thylene</i>	6, 10, 11	4	Negativo	Negativo
<i>Vampyriscus nymphaea</i>	8, 9, 10	6	Negativo	Negativo
<i>Vampyrodes caraccioli</i>	10	1	Negativo	Negativo
<i>Vampyrodes major</i>	7, 11	2	Negativo	Negativo

Se observan las 48 especies analizadas, los sitios de colecta enumerados del 1 al 12 (**Figura 10**), la cantidad de muestras por especie y los resultados de las amplificaciones. 1- Mount Totumas Cloud Forest- Provincia de Chiriquí, 2- Fortuna Cabins-Comarca Ngäbe-Buglé, 3- Calobre-Provincia de Veraguas, 4- La Saldaña-Provincia de Coclé, 5- Centro Regional Universitario de Coclé- Provincia de Coclé,6- Parque Nacional Soberanía-Provincia de Panamá, 7- Summit rainforest & golf resort-Provincia de Panamá, 8- Parque Natural Metropolitano- Provincia de Panamá, 9- Cerro Azul- Provincia de Panamá, 10- Valle de Mamoní- Provincia de Panamá, 11- Reserva Privada Bunorgándi- Provincia de Panamá y 12- Centro Regional Universitario de Darién- Provincia de Darién.

DISCUSIÓN

Capítulo V

Discusión

Se han detectado más de 60 virus de ARN diferentes, alojados en murciélagos (Dominguez et al., 2007). Los murciélagos son reservorios naturales de varios virus emergentes incluyendo SARS-CoV-2 (Hu et al., 2021). La reciente pandemia de COVID-19 hace necesario crear programas de vigilancia y monitoreo de la presencia de coronavirus en poblaciones naturales de murciélagos especialmente de *betacoronavirus* que en principio podrían producir nuevos brotes (Li et al., 2020).

En Panamá se han registrado 118 de las 145 especies de murciélagos reportadas para Centro América (Medina-Fitoria et al., 2020; Samudio & Pino, 2014). A pesar de la cantidad de especies registradas en nuestro país sólo se ha realizado un estudio para determinar la presencia de coronavirus en murciélagos (Corman et al., 2013). En este estudio se analizaron 1394 muestras de heces de murciélagos de Costa Rica, Ecuador, Brasil y Panamá, de las cuales 714 fueron colectadas en nuestro país y pertenecen a 30 especies. En nuestro estudio la cantidad de especies muestreadas fue mayor (48) a pesar de que la cantidad de muestras fue menor. Dieciséis de las especies muestreadas fueron las mismas en ambos estudios.

En las muestras colectadas en Panamá se detectaron coronavirus sólo en *Artibeus jamaicensis* (3), *Artibeus lituratus* (2) y *Phyllostomus discolor* (2). El porcentaje de positividad observado fue de 0.9 %. Sin embargo, por especie el porcentaje de positividad fue de 1.02 % (3/295), 4.76% (2/42) y 20% (2/10) para *A. jamicensis*, *A. lituratus* y *P. discolor* respectivamente.

La tasa de prevalencia de coronavirus en murciélagos varía entre 3 a 10 % (Bittar et al., 2020) No obstante, un estudio global en el cual se analizaron 12,000 muestras reporta una tasa de 8.6 % (Anthony et al., 2017). Estudios realizados en once países de América reportan una positividad que varía por país entre 0.3 a 29.3 % (Hernández-Aguilar et al., 2021).

Diversos factores pueden influir en la detección y el porcentaje de positividad de coronavirus en murciélagos incluyendo el tamaño y tipo de muestra, la etapa de desarrollo, patrones temporales, disponibilidad de alimento, el tipo de especie, el hábitat, ciclo reproductivo, edad y densidad de las colonias (Kessler et al., 2018; Montecino-Latorre et al., 2020).

Con base en el porcentaje de positividad por especie reportado por Corman *et al.* (2013), la detección de una muestra positiva en las especies que resultaron positivas requería de 98 muestras de *A. jamaicensis*, 21 de *A. lituratus* y 5 de *P. discolor*. Un porcentaje de positividad de sólo 1% fue reportado en 421 muestras de heces e hisopados rectales realizado en Costa Rica (Moreira-Soto et al., 2015). En este estudio las especies positivas fueron *A. jamaicensis* (1/76), *Carollia perspicilata* (1/49), *Carollia castanea* (1/16) y *Glossophaga soricina* (1/21). La cantidad de muestras colectadas de estas especies en nuestra investigación fue inferior a la colectada en ambos estudios (**Cuadro 8**). Es probable que la cantidad de muestras por especie colectadas en nuestro estudio fue uno de los factores que limitó la probabilidad de detección de positivos. Resultados negativos también fueron reportados en un estudio realizado en Malasia en donde sólo se analizaron 29 muestras (Tamam et al., 2022). No obstante, se han detectado positivos en especies como *Lichonycteris obscura*, *Lonchorhina aurita*, *Cynomops planirostris* y *Myotis*

riparius en donde la cantidad de muestras fue cinco o menos, sin embargo, en *Saccopteryx bilineata*, *Sturnira hondurensis* y *Phyllostomus hastatus* se analizaron más de cien individuos y no se detectaron positivos. Estas diferencias en tasas de positividad indican que unas especies de murciélagos son más susceptibles a la infección por coronavirus que otras (Hernández-Aguilar et al., 2021). Con base en estas tasas de variación se sugiere que se deben obtener entre 150 a 400 muestras fecales por especie para maximizar la probabilidad de detección de positivos (Anthony et al., 2017).

El tipo de muestra es fundamental en la detección de coronavirus en murciélagos ya que la probabilidad de detección está relacionada con la concentración del virus en la muestra. Los coronavirus presentan tropismo hacia el tracto intestinal (Lau et al., 2005; Tang et al., 2006; Wong et al., 2019). Por lo tanto, existe mayor concentración de partículas virales en heces que en otro tipo de muestras. Todas las muestras utilizadas en nuestro estudio fueron hisopados rectales o heces. Por consiguiente, el tipo de muestra en nuestro caso no sugiere ser un factor que incidió en los resultados observados.

La etapa de desarrollo parece ser un factor asociado al porcentaje de positividad. Un porcentaje de positividad de 51.09 % fue observado en juveniles con respecto a 26.22 % en adultos (Montecino-Latorre et al., 2020). Una mayor positividad en juveniles fue también observada en otros estudios (Anthony et al., 2017; Baldwin & Hons, 2015; Gloza-Rausch et al., 2008; Osborne et al., 2011; Rihtarič et al., 2010; Wacharapluesadee et al., 2018). La disminución de anticuerpos maternos recibidos pasivamente de la madre se ha sugerido como una de las causas del incremento de la carga viral en juveniles, y por tanto, la posibilidad de detección de coronavirus (Drexler et al., 2011). En nuestro estudio se lograron capturar sólo quince (15) juveniles; es decir 6.91 % (15/217) de todas las muestras

analizadas fueron juveniles. La distribución de muestras de juveniles por especie fue de *Artibeus jamaicensis* (6), *Vampyriscus nymphaea* (3), *Myotis sp.* (2), *Uroderma convexum* (1), *Artibeus toltecus* (1), *Sturnina sp* (1) y *Carollia perspicillata* (1) (**Cuadro 8**).

Se ha reportado variación en la prevalencia de coronavirus de murciélagos a lo largo de los doce meses del año. En un estudio realizado en Hong Kong, la prevalencia de coronavirus SARSr-Rh-BatCov y Rh-BatCov HKU2 fue mayor en primavera (marzo-mayo) cuando el clima es cálido y húmedo y se inician las primeras precipitaciones de verano (junio) que en las otras estaciones del año (Lau et al., 2005). En Tailandia se detectaron adultos y juveniles positivos para coronavirus en el período comprendido entre los meses de mayo a octubre; mientras que sólo adultos y sólo juveniles resultaron positivos en los meses de enero y abril respectivamente (Wacharapluesadee et al., 2018). Estas variaciones temporales en las concentraciones del virus pueden incidir en la probabilidad de detección de positivos. En la provincia de Yunan, China se observó que la probabilidad de detección de SL-Cov fue mayor en el período entre finales de verano y otoño y que las variaciones pueden estar relacionadas al hábito de vida de la especie (Wang et al., 2016). En países de África y Asia se detectaron más positivos para coronavirus en temporada seca que en la lluviosa (Anthony et al., 2017).

Las muestras en nuestro estudio fueron colectadas desde julio de 2021 a octubre de 2022; sin embargo, la mayoría de las muestras (76%) fueron colectadas en la estación lluviosa (julio a diciembre). Es probable que este fenómeno de variación estacional de la prevalencia observada en otros países también ocurra en Panamá, lo que podría explicar los resultados negativos observados.

La escasez de alimento puede causar estrés e incidir en la respuesta inmune en murciélagos y por lo tanto hacerlos más susceptibles a la infección. En *Carollia perspicillata* la privación de alimentos retrasa la respuesta metabólica del sistema inmune ante la exposición con lipopolisacáridos bacterianos (Cabrera-Martinez et al., 2018).

En un estudio realizado en la isla de Barro Colorado se determinó que la principal fuente de alimento durante la mayor parte del año de *A. jamaicensis* y *A. lituratus* son los frutos de higo, que en la última parte de la estación húmeda y al inicio de la estación seca escasean (Bonaccorso et al., 1979). Independientemente que las muestras de *A. jamaicensis* y *A. lituratus* no fueron colectadas en Barro Colorado la disponibilidad del fruto es el mismo a nivel nacional.

En adición, se ha reportado que el tipo de dieta influye en el riesgo de infección por parásitos o patógenos en murciélagos en ambientes naturales (DeAnglis et al., 2024; Ruiz-Aravena et al., 2022). Las especies de murciélagos carnívoras y hematófagas tienen un mayor riesgo de adquirir enfermedades infecciosas incluyendo parásitos y patógenos como resultado del contacto entre el murciélago y su presa lo cual facilita además la transmisión (Schneeberger et al., 2013). De las tres especies en Panamá que han sido reportadas positivas (Corman et al., 2013), dos son fundamentalmente frugívoras (*A. jamaicensis* y *A. lituratus*) y sólo *P. discolor* es omnívoro ya que se alimenta principalmente de insectos, carne y también de frutos y néctar.

En adición, eventos relacionados con el ciclo reproductivo como el embarazo y lactancia pueden inducir estrés fisiológico y energético e influir en la actividad antiviral (French et al., 2009). En murciélagos insectívoros del trópico *Mormopterus francoismoutoui* se observó un marcado incremento en la tasa de detección de coronavirus

después del nacimiento (Joffrin et al., 2022). En nuestro estudio no se observaron hembras grávidas ni en período de lactancia.

El tamaño, la densidad, la composición de la colonia y del refugio son factores que pueden también afectar la prevalencia cambiando la tasa de transmisión (Ruiz-Aravena et al., 2022). Se observó una mayor prevalencia de SARSr-CoVs en refugios en donde la especie más abundante era *Rhinolophus sinicus*, mientras que una menor prevalencia fue detectada en el mismo refugio cuando la especie más abundante fue *Aselliscus stoli* (Hu et al., 2017).

El tamaño del refugio y la localización incluyendo si es una cueva o no parece afectar la probabilidad de transmisión del virus entre especies como resultado del contacto físico estrecho en cuevas con alta densidad de individuos (Willoughby et al., 2017). Debido a que las muestras analizadas en nuestro estudio fueron colectadas de individuos capturados mediante el uso de redes en posibles rutas de vuelo, no se obtuvo información del tipo de refugio ni la densidad de las colonias.

La obtención en nuestro estudio de resultados negativos en la detección de coronavirus no necesariamente implica que los murciélagos en Panamá no sean reservorios de coronavirus. Nuestros resultados sugieren que la prevalencia de coronavirus en las especies de murciélagos colectadas en Panamá es considerablemente baja, lo cual no permitió detectar positivos como resultado de la cantidad de muestras analizadas por especies.

No se descarta la posibilidad que la concentración del virus (carga viral) haya estado por debajo de los límites del tipo de PCR utilizado en nuestro estudio.

Sin embargo, a pesar de las posibles fuentes de variación que incluyen la variación de la carga viral, descartamos la posibilidad que los resultados obtenidos sean consecuencia de los procedimientos utilizados en la extracción de ARN, síntesis de cDNA y amplificación, ya que, estos procedimientos fueron validados con los resultados obtenidos en la amplificación de la proteína de la cubierta de CTV a partir de hojas de cítricos infectas con este virus.

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES

Capítulo VI

Conclusiones y recomendaciones

No se detectaron positivos para coronavirus en ninguna de las 217 muestras fecales colectadas de 48 especies de murciélagos en Panamá. Los resultados obtenidos en este estudio no necesariamente implican que los murciélagos en nuestro país no sean reservorios naturales de coronavirus si no que la prevalencia y/o la carga viral requiere de un número mayor de muestras por especie y métodos que permitan la detección de positivos en muestras con cargas virales bajas. Por consiguiente, recomendamos utilizar PCR en tiempo real para aumentar la probabilidad de detectar aquellas muestras con carga viral baja e incrementar la cantidad de muestras por especie. Es necesario también incrementar la cantidad de especies y extender el período de muestreo con el propósito de cubrir todos los meses de la temporada lluviosa y la seca. Se recomienda también realizar colectas en refugios como cuevas y otros en donde se halla previamente identificado la presencia de varias especies con colonias con altas densidades.

Finalmente recomendamos implementar un programa permanente de monitoreo para la detección de coronavirus en poblaciones naturales de murciélagos a nivel nacional.

Literatura citada

- Abbasi, H., Tabaraei, A., Hosseini, S. M., Khosravi, A., & Nikoo, H. R. (2022). Real-time PCR Ct value in SARS-CoV-2 detection: RdRp or N gene? In *Infection* (Vol. 50, Issue 2, pp. 537–540). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01674-x>
- Abdel-Moneim, A., & Abdelwhab, E. (2020). Evidence for SARS-COV-2 infection of animal hosts. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 7, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529>
- Ángel, M., & Valdés, S. (2017). *Fiebre amarilla: vale la pena una revisión en el contexto epidemiológico actual Yellow Fever: It worth a review in the current epidemiological context*. <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/3286>
- 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. (2017). Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vex012>
- Anthony, S. J., Ojeda-Flores, R., Rico-Chávez, O., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C. M., Rostad, M. K., Epstein, J. H., Tipps, T., Liang, E., Sanchez-Leon, M., Sotomayor-Bonilla, J., Aguirre, A. A., Ávila-Flores, R. A., Medellín, R. A., Goldstein, T., Suzán, G., Daszak, P., & Lipkin, W. I. (2013). Coronaviruses in bats from Mexico. *Journal of General Virology*, 94(PART 5), 1028–1038. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049759-0>

- Babkin, I. V., & Babkina, I. N. (2015). The origin of the variola virus. In *Viruses* (Vol. 7, Issue 3, pp. 1100–1112). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v7031100>
- Baldwin, H., & Hons, B. (. (2015). *Epidemiology and ecology of virus and host: bats and coronaviruses in Ghana, West Africa.*
- Banerjee, A. (2018). *Dynamics of bat-coronavirus interactions: role of innate antiviral responses.*
- Banerjee, A., Baker, M. L., Kulcsar, K., Misra, V., Plowright, R., & Mossman, K. (2020). Novel Insights Into Immune Systems of Bats. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00026>
- Berche, P. (2022). Life and death of smallpox. In *Presse Medicale* (Vol. 51, Issue 3). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104117>
- 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>
- Bonaccorso, F. J., Kunz, T. H., & Bonaccorsol, F. J. (1979). *FORAGING AND REPRODUCTIVE ECOLOGY IN A PANAMANIAN BAT COMMUNITY* (Vol. 24).
- Breman, J., & Henderson, D. (2002). Review Article Current Concepts 1300 . In *National Institutes of Health* (Vol. 346, Issue 17). www.nejm.org
- Burnette', W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 112).

Cabanillas, L. E., Risco, L. A., Risco, L. K., Hoyos, L. G., Zavaleta, L. R., Tirado, L. E., A, M. B., & J, H. S. (2021). Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, 21(2), 417–432. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v21i1.3327>

Cabrera-Martinez, L. V., Herrera M., L. G., & Cruz-Neto, A. P. (2018). Food restriction, but not seasonality, modulates the acute phase response of a Neotropical bat. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 229, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.12.003>

Camille Lebarbenchon, Beza Ramasindrazana, Léa Joffrin, Sandra Bos, Erwan Lagadec, Gildas Le Minter, Yann Gomard, Pablo Tortosa, David A Wilkinson, S. M. G. & P. M. (2017). Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerging Microbes & Infections*,. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.47>

Cantoni, D., Mayora-Neto, M., Thakur, N., Elrefaey, A. M. E., Newman, J., Vishwanath, S., Nadesalingam, A., Chan, A., Smith, P., Castillo-Olivares, J., Baxendale, H., Charleston, B., Heeney, J., Bailey, D., & Temperton, N. (2022). Pseudotyped Bat Coronavirus RaTG13 is efficiently neutralised by convalescent sera from SARS-CoV-2 infected patients. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03325-9>

- Chan, J. F. W., To, K. K. W., Tse, H., Jin, D. Y., & Yuen, K. Y. (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. In *Trends in Microbiology* (Vol. 21, Issue 10, pp. 544–555). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.05.005>
- Chen, J., Zhou, T., Zhang, Y., Luo, S., Chen, H., Chen, D., Li, C., & Li, W. (2022). The reservoir of latent HIV. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.945956>
- Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., Wan, C. K. C., Yang, P., Wang, Q., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*, 66(4), 549–555. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa029>
- Cordero, R. B. (2017). *Revisión de Tema: Patogénesis del VIH/SIDA*.
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., Van Der Veer, B., Van Den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Corman, V. M., Rasche, A., Diallo, T. D., Cottontail, V. M., Stöcker, A., Souza, B. F. de C. D., Corrêa, J. I., Carneiro, A. J. B., Franke, C. R., Nagy, M., Metz, M., Knörnschild, M., Kalko, E. K. V., Ghanem, S. J., Morales, K. D. S., Salsamendi, E., Spínola, M.,

- Herrler, G., Voigt, C. C., ... Drexler, J. F. (2013). Highly diversified coronaviruses in neotropical bats. *Journal of General Virology*, 94(PART9), 1984–1994. <https://doi.org/10.1099/vir.0.054841-0>
- Cuadra, T. E., Guadrón Meléndez, A. A., Cruz Aguilar, R. D. J., & Vásquez Rodríguez, E. A. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta, Revista Científica Del Instituto Nacional de Salud*, 4(1), 31–39. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 181–192). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Das, A., Ahmed, R., Akhtar, S., Begum, K., & Banu, S. (2021). An overview of basic molecular biology of SARS-CoV-2 and current COVID-19 prevention strategies. In *Gene Reports* (Vol. 23). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101122>
- DeAnglis, I. K., Andrews, B. R., Lock, L. R., Dyer, K. E., Yang, A., Volokhov, D. V., Fenton, M. B., Simmons, N. B., Downs, C. J., & Becker, D. J. (2024). Bat cellular immunity varies by year and dietary habit amidst land conversion. *Conservation Physiology*, 12(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coad102>
- Díaz-Castrillón, F., & Toro-Montoya, A. (2020). *SARS-CoV-2/COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia*.
- 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>

Dong, B., Zhang, G., Zhang, X., Chen, X., Zhang, M., Li, L., & Lin, W. (2021). Development of an indirect ELISA based on spike protein to detect antibodies against feline coronavirus. *Viruses*, *13*(12). <https://doi.org/10.3390/v13122496>

DR.Rafael Samudio JR. (2007). *Taller nacional de especialistas para la evaluación del estado de las especies de murciélagos de Panamá.*

Drexler, J. F., Corman, V. M., & Drosten, C. (2014). Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. In *Antiviral Research* (Vol. 101, Issue 1, pp. 45–56). <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.013>

Drexler, J. F., Corman, V. M., Wegner, T., Tateno, A. F., Zerbinati, R. M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Müller, M. A., & Drosten, C. (2011). Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(3), 449–456. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100526>

Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A. M., Berger, A., Burguière, A.-M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.-C., Müller, S., ... Doerr, H. W. (2003). Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *348*(20), 1967–1976. <https://doi.org/10.1056/nejmoa030747>

Engvall E, & Perlmann P. (1971). *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0019->

2791(71)90454-X

- F. Lucero Arteaga, M. M. , N. M. , M. A. M. , J. C. B. , G. M. C. , S. M. , A. C. B. (2022). Circulation of coronavirus in bats from northern and central Argentina: preliminary study. *International Journal of Infectious Diseases*, *116*, S75–S76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.12.181>
- Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z. L., & Zhou, P. (2019). Bat coronaviruses in China. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v11030210>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In *Coronaviruses: Methods and Protocols* (pp. 1–23). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Folimonova, S. Y. (2020). Citrus tristeza virus: A large RNA virus with complex biology turned into a valuable tool for crop protection. *PLoS Pathogens*, *16*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008416>
- French, S. S., Moore, M. C., & Demas, G. E. (2009). Ecological immunology: The organism in context. *Integrative and Comparative Biology*, *49*(3), 246–253. <https://doi.org/10.1093/icb/icp032>
- Galeana, P. (2020). *LAS EPIDEMIAS A LO LARGO DE LA HISTORIA* (Vol. 5, Issue 10). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_
- Galindo-González, J. (2022). Live animal markets: Identifying the origins of emerging infectious diseases. In *Current Opinion in Environmental Science and Health* (Vol. 25). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100310>

Gloza-Rausch, Ipsen, A., Seebens, A., Götsche, M., Panning, M., Drexler, J. F., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., & Marcel Müller,§ Susanne Pfefferle, and C. D. (2008). *Detection and Prevalence Patterns of Group I Coronaviruses in Bats, Northern Germany*.

Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. In *Nature Microbiology* (Vol. 5, Issue 4, pp. 536–544). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

Gorbalenya, A. E., Krupovic, M., Mushegian, A., Kropinski, A. M., Siddell, S. G., Varsani, A., Adams, M. J., Davison, A. J., Dutilh, B. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Junglen, S., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., ... Kuhn, J. H. (2020). The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. In *Nature Microbiology* (Vol. 5, Issue 5, pp. 668–674). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0709-x>

Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and sars-cov-2. In *Turkish Journal of Medical Sciences* (Vol. 50, Issue SI-1, pp. 549–556). Turkiye Klinikleri. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>

Hernández-Aguilar, I., Lorenzo, C., Santos-Moreno, A., Naranjo, E. J., & Navarrete-Gutiérrez, D. (2021). Coronaviruses in bats: A review for the americas. In *Viruses*

(Vol. 13, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v13071226>

Hu, B., Ge, X., Wang, L. F., & Shi, Z. (2015). Bat origin of human coronaviruses
Coronaviruses: Emerging and re-emerging pathogens in humans and animals Susanna
Lau Positive-strand RNA viruses. In *Virology Journal* (Vol. 12, Issue 1). BioMed
Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0422-1>

Hu, D., Zhu, C., Ai, L., He, T., Wang, Y., Ye, F., Yang, L., Ding, C., Zhu, X., Lv, R., Zhu,
J., Hassan, B., Feng, Y., Tan, W., & Wang, C. (2018). Genomic characterization and
infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerging Microbes and
Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0155-5>

Hu, Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-
19. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 141–154). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

Hu, Zeng, L. P., Yang, X. Lou, Ge, X. Y., Zhang, W., Li, B., Xie, J. Z., Shen, X. R., Zhang,
Y. Z., Wang, N., Luo, D. S., Zheng, X. S., Wang, M. N., Daszak, P., Wang, L. F., Cui,
J., & Shi, Z. L. (2017). Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related
coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS
Pathogens*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>

Huang, Y. W., Dickerman, A. W., Piñeyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T.,
& Meng, X. J. (2013). Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine
epidemic diarrhea virus strains in the united states. *MBio*, 4(5).
<https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13>

- Huang, Y., Yang, C., Xu, X.-F., Xu, W., & Liu, S.-W. (2020). Propiedades estructurales y funcionales de la proteína espiga del SARS-CoV-2: desarrollo potencial de fármacos antivirales para COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*, 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Huerta López, J. G. (2014). *La influenza* (Vol. 23).
- Hung, T. H., WU, M. ., & SU, H. . (2000). *A Rapid Method Based on the One-step Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique for Detection of Different Strains of Citrus Tristeza Virus.*
- Joffrin, L., Goodman, S. M., Wilkinson, D. A., Ramasindrazana, B., Lagadec, E., Gomard, Y., Le Minter, G., Dos Santos, A., Corrie Schoeman, M., Sookhareea, R., Tortosa, P., Julienne, S., Gudo, E. S., Mavingui, P., & Lebarbenchon, C. (2020). Bat coronavirus phylogeography in the Western Indian Ocean. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63799-7>
- Joffrin, L., Hoarau, A. O. G., Lagadec, E., Torrontegi, O., Köster, M., Le Minter, G., Dietrich, M., Mavingui, P., & Lebarbenchon, C. (2022). Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. *Royal Society Open Science*, *9*(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.211600>
- Kahn, J. S., & McIntosh, K. (2005). Discussion. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *24*(11 SUPPL.), 223–227. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000188166.17324.60>
- Kessler, M. K., Becker, D. J., Peel, A. J., Justice, N. V., Lunn, T., Crowley, D. E., Jones, D. N., Eby, P., Sánchez, C. A., & Plowright, R. K. (2018). Changing resource

- landscapes and spillover of henipaviruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1429(1), 79–99. <https://doi.org/10.1111/nyas.13910>
- Kettenburg, G., Kistler, A., Ranaivoson, H. C., Ahyong, V., Andrianiaina, A., Andry, S., DeRisi, J. L., Gentles, A., Raharinosy, V., Randriambolamanantsoa, T. H., Ravelomanantsoa, N. A. F., Tato, C. M., Dussart, P., Heraud, J. M., & Brook, C. E. (2022). Full Genome Nobecovirus Sequences From Malagasy Fruit Bats Define a Unique Evolutionary History for This Coronavirus Clade. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.786060>
- Kiiza, P., Mullin, S., Teo, K., Adhikari, N. K. J., & Fowler, R. A. (2020). Treatment of Ebola-related critical illness. In *Intensive Care Medicine* (Vol. 46, Issue 2, pp. 285–297). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05949-z>
- King, A. (2021). Down on the farm. *EMBO Reports*, 22(9). <https://doi.org/10.15252/embr.202153701>
- King, A., Adams, M., Carstens, E., & Lefkowitz, E. (2011). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Part II-The Positive Sense Single Stranded RNA Viruses*.
- Ksiazek, T. G. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 1953–1966.
- Lau, S. K., Y Woo, P. C., M Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H.-W., L Wong, B. H., Y Wong, S. S., Leung, S.-Y., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2005). *Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats*.

www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0506735102

Li, B., Si, H.-R., Zhu, Y., Yang, X.-L., Anderson, D. E., Shi, Z.-L., Wang, L.-F., & Zhou, P. (2020). Discovery of Bat Coronaviruses through Surveillance and Probe Capture-Based Next-Generation Sequencing. *MSphere*, 5(1).
<https://doi.org/10.1128/msphere.00807-19>

Maclachlan, N., & Dubovi, E. (2017). Coronaviridae. *Fenner's Veterinary Virology*, January, 435–461.

MacLean, O. A., Lytras, S., Weaver, S., Singer, J. B., Boni, M. F., Lemey, P., Kosakovsky Pond, S. L., & Robertson, D. L. (2021). Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen. *PLoS Biology*, 19(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001115>

Magatheshvaren Saras, M. A., Patro, L. P. P., Uttamrao, P. P., & Rathinavelan, T. (2022). Geographical distribution of SARS-CoV-2 amino acids mutations and the concomitant evolution of seven distinct clades in non-human hosts. *Zoonoses and Public Health*, 69(7), 816–825. <https://doi.org/10.1111/zph.12971>

Markotter, W., Coertse, J., De Vries, L., Geldenhuys, M., & Mortlock, M. (2020). Bat-borne viruses in Africa: a critical review. In *Journal of Zoology* (Vol. 311, Issue 2, pp. 77–98). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jzo.12769>

Medina-Fitoria, A., Ávila-Palma, H. D., Martínez, M., Ordoñez-Mazier, D. I., & Turcios-Casco, M. A. (2020). Los murciélagos (Chiroptera) del Caribe de Honduras y Nicaragua: una comparación sobre su diversidad en cinco diferentes coberturas

vegetales. *Neotropical Biodiversity*, 6(1), 147–161.
<https://doi.org/10.1080/23766808.2020.1804748>

Montecino-Latorre, D., Goldstein, T., Gilardi, K., Wolking, D., Van Wormer, E., Kazwala, R., Ssebide, B., Nziza, J., Sijali, Z., Cranfield, M., & Mazet, J. A. K. (2020). Reproduction of East-African bats may guide risk mitigation for coronavirus spillover. *One Health Outlook*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42522-019-0008-8>

Montecino-Latorre, D., Goldstein, T., Kelly, T. R., Wolking, D. J., Kindunda, A., Kongo, G., Bel-Nono, S. O., Kazwala, R. R., Suu-Ire, R. D., Barker, C. M., Johnson, C. K., & Mazet, J. A. K. (2022). Seasonal shedding of coronavirus by strawcolored fruit bats at urban roosts in Africa. *PLoS ONE*, 17(9 September).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274490>

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>

Nabi, G., Siddique, R., Ali, A., & Khan, S. (2020). Preventing bat-born viral outbreaks in future using ecological interventions. In *Environmental Research* (Vol. 185). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109460>

Octavio-Aguilar, P., & Tolentino Mendoza, M. E. (2023). Historia natural de los coronavirus y el desarrollo de vacunas. *Herreriana*, 5(1), 43–60.
<https://doi.org/10.29057/h.v5i1.8592>

- OMS. (2020). *WHO Coronavirus Diseases (COVID-19)*. <https://covid19.who.int/>
- Osborne, C., Cryan, P. M., O'Shea, T. J., Oko, L. M., Ndaluka, C., Calisher, C. H., Berglund, A. D., Klavetter, M. L., Bowen, R. A., Holmes, K. V., & Dominguez, S. R. (2011). Alphacoronaviruses in new World bats: Prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019156>
- Payne, S. (2017). Family Coronaviridae. In *Viruses* (pp. 149–158). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00017-9>
- Peeri, N. C., Shrestha, N., Siddikur Rahman, M., Zaki, R., Tan, Z., Bibi, S., Baghbanzadeh, M., Aghamohammadi, N., Zhang, W., & Haque, U. (2021). The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? In *International Journal of Epidemiology* (Vol. 49, Issue 3, pp. 717–726). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/IJE/DYAA033>
- Poon, L. L. M. (2005). Identification of a novel coronavirus in bats. *J Virol Methods*. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005>
- Quan, P. L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J. A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., Hutchison, S. K., Egholm, M., Osinubi, M. O. V., Niezgod, M., Ogunkoya, A. B., Briese, T., Rupprecht, C. E., & Ian Lipkin, W. (2010). Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00208-10>

- Quinteros, J. A., Noormohammadi, A. H., Lee, S. W., Browning, G. F., & Diaz-Méndez, A. (2022). Genomics and pathogenesis of the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Australian Veterinary Journal*, *100*(10), 496–512. <https://doi.org/10.1111/avj.13197>
- Rihtarič, D., Hostnik, P., Steyer, A., Grom, J., & Toplak, I. (2010). Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Archives of Virology*, *155*(4), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0612-5>
- 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. (2022). Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 5, pp. 299–314). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>
- Rulli, M. C., D’Odorico, P., Galli, N., & Hayman, D. T. S. (2021). Land-use change and the livestock revolution increase the risk of zoonotic coronavirus transmission from rhinolophid bats. *Nature Food*, *2*(6), 409–416. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00285-x>
- Saif, L. J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 26, Issue 2, pp. 349–364). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- Samudio, R. J., & Pino, J. L. (2014). *Historia de la Mastozoología en Panamá*.

- Schneeberger, K., Czirják, G. Á., & Voigt, C. C. (2013). Measures of the Constitutive Immune System Are Linked to Diet and Roosting Habits of Neotropical Bats. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054023>
- Simabuco, F. M., Tamura, R. E., Pavan, I. C. B., Morale, M. G., & Ventura, A. M. (2021). Molecular mechanisms and pharmacological interventions in the replication cycle of human coronaviruses. *Genetics and Molecular Biology*, 44(1), 1–18. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0212>
- Stockman LJ, H. L. M. C. H. J. R. C. K. T. (2008). *Coronavirus Antibodies in Bat Biologists*. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/print.html
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E., & Canard, B. (2014). SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: Replicative enzymes as antiviral targets. In *Antiviral Research* (Vol. 101, Issue 1, pp. 122–130). <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.11.006>
- Tamam, M. B., Ramadani, A. H., & Mahbubillah, M. A. (2022). Deteksi coronavirus pada kelelawar di Kabupaten Lamongan. *Livestock and Animal Research*, 20(1), 83. <https://doi.org/10.20961/lar.v20i1.56667>
- Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., Duan, Y., Zhang, H., Wang, Y., Qian, Z., Cui, J., & Lu, J. (2020). On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2.

National Science Review, 7(6), 1012–1023. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>

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

Temmam, S., Vongphayloth, K., Baquero Salazar, E., Munier, S., & Bonomi, M. (2022). Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells 1. In *Yasaman Karami* (Vol. 3, Issue 6). Paul T. Brey.

Towbin, H., Staehelint, T., & Gordon, J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography)* (Vol. 76, Issue 9). <https://www.pnas.org>

Truong, T. T., Ryutov, A., Pandey, U., Yee, R., Goldberg, L., Bhojwani, D., Aguayo-Hiraldo, P., Pinsky, B. A., Pekosz, A., Shen, L., Boyd, S. D., Wirz, O. F., Röltgen, K., Bootwalla, M., Maglente, D. T., Ostrow, D., Ruble, D., Han, J. H., Biegel, J. A., ... Dien Bard, J. (2021). Increased viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection: A consecutive case series. *EBioMedicine*, 67. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103355>

V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol.

19, Issue 3, pp. 155–170). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

Valencia, A., Delgado, K., & Ruíz-Sáenz, J. (2021). Diagnóstico Serológico Y Molecular Del Coronavirus Felino En Las Américas. *Revista MVZ Cordoba*, 26(2), 1–12. <https://doi.org/10.21897/RMVZ.2041>

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(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0950-6>

Wacharapluesadee, S., Duengkae, P., Rodpan, A., Kaewpom, T., Maneeorn, P., Kanchanasaka, B., Yingsakmongkon, S., Sittidetboripat, N., Chareesaen, C., Khlangsap, N., Pidthong, A., Leadprathom, K., Ghai, S., Epstein, J. H., Daszak, P., Olival, K. J., Blair, P. J., Callahan, M. V., & Hemachudha, T. (2015). Diversity of coronavirus in bats from Eastern Thailand Emerging viruses. *Virology Journal*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0289-1>

Walker, G. J., Naing, Z., Stella, A. O., Yeang, M., Caguicla, J., Ramachandran, V., Isaacs, S. R., Agapiou, D., Bull, R. A., Stelzer-Braid, S., Daly, J., Gosbell, I. B., Hoad, V. C., Irving, D. O., Pink, J. M., Turville, S., Kelleher, A. D., & Rawlinson, W. D. (2021). Sars coronavirus-2 microneutralisation and commercial serological assays correlated closely for some but not all enzyme immunoassays. *Viruses*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/v13020247>

- Wang, M. N., Zhang, W., Gao, Y. T., Hu, B., Ge, X. Y., Yang, X. Lou, Zhang, Y. Z., & Shi, Z. L. (2016). Longitudinal surveillance of SARS-like coronaviruses in bats by quantitative real-time PCR. In *Virologica Sinica* (Vol. 31, Issue 1, pp. 78–80). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3703-3>
- Wang, Y., Grunewald, M., & Perlman, S. (2020). Coronaviruses: An Updated Overview of Their Replication and Pathogenesis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2203, pp. 1–29). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0900-2_1
- Wang, Zhang, W., Gao, Y. T., Hu, B., Ge, X. Y., Yang, X. Lou, Zhang, Y. Z., & Shi, Z. L. (2016). Longitudinal surveillance of SARS-like coronaviruses in bats by quantitative real-time PCR. In *Virologica Sinica* (Vol. 31, Issue 1, pp. 78–80). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3703-3>
- 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>
- Waters, M. . D. A. . M. T. . A. D. . W. S. . & H. C. (2022). *The Coronavirus Pandemic and the Future: Vol. Volumen 1* (Royal Society of Chemistry. (ed.)). (Original work published 2022).
- Weiss, S. R., & Leibowitz, J. L. (2011). Coronavirus pathogenesis. In *Advances in Virus Research* (Vol. 81, Issue January). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885->

6.00009-2

Wendong Li. (2005). Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science*, 310(5748), 674–676. <https://doi.org/10.1126/science.1118476>

Wilfinger W, W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectro-photometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481.

Willoughby, A. R., Phelps, K. L., & Olival, K. J. (2017). A comparative analysis of viral richness and viral sharing in cave-roosting bats. *Diversity*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/d9030035>

Wong, A. C. P., Li, X., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2019). Global epidemiology of bat coronaviruses. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v11020174>

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y., & Yuen, K. Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine*, 234(10), 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Li, K. S. M., Poon, R. W. S., Wong, B. H. L., Tsoi, H. wah, Yip, B. C. K., Huang, Y., Chan, K. hung, & Yuen, K. yung. (2006). Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*, 351(1), 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.041>

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Yip, C. C. Y., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2006). Comparative Analysis of 22 Coronavirus HKU1 Genomes Reveals a

- Novel Genotype and Evidence of Natural Recombination in Coronavirus HKU1. *Journal of Virology*, 80(14), 7136–7145. <https://doi.org/10.1128/jvi.00509-06>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2006). Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: Zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 401–407. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244043.08264.fc>
- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). *IMMUNOASSAY OF ENDOGENOUS PLASMA INSULIN IN MAN*. 1157–1175.
- Yan, Y., Shin, W. I., Pang, Y. X., Meng, Y., Lai, J., You, C., Zhao, H., Lester, E., Wu, T., & Pang, C. H. (2020). The first 75 days of novel coronavirus (SARS-CoV-2) outbreak: Recent advances, prevention, and treatment. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072323>
- Yang, Y., Peng, F., Wang, R., Guan, K., Jiang, T., Xu, G., Sun, J., & Chang, C. (2020). The Deadly Coronaviruses: The 2003 SARS Pandemic and The 2020 Novel Coronavirus Epidemic in China , The Company’ s Public News and Information. *Journal of Autoimmunity*, 109(January), 102487. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841120300470?via%3Dihub>
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi

- Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1211721>
- Zhang, G., Li, B., Yoo, D., Qin, T., Zhang, X., Jia, Y., & Cui, S. (2021). Animal coronaviruses and SARS-CoV-2. In *Transboundary and Emerging Diseases* (Vol. 68, Issue 3, pp. 1097–1110). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13791>
- Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020). 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. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>
- Zhu, Q., Li, B., & Sun, D. (2022). Advances in Bovine Coronavirus Epidemiology. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14051109>
- Zhu, W., Huang, Y., Gong, J., Dong, L., Yu, X., Chen, H., Li, D., Zhou, L., Yang, J., & Lu, S. (2023). A novel bat coronavirus with a polybasic furin-like cleavage site. *Virologica Sinica*, 38(3), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2023.04.009>

