



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Maestría en Sanidad Animal

Detección de virus respiratorios de la familia *Coronaviridae* en quirópteros urbanos de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Magister en Sanidad Animal

AUTORA:

MVZ. Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

DIRECTOR:

Blgo. Jorge Isaac Armijos Rivera, PhD

Loja – Ecuador

2024

Certificación

Loja, 14 de agosto del 2022

Blgo. Jorge Isaac Armijos Rivera, PhD.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

C E R T I F I C O:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del Trabajo de Titulación denominado: **Detección de virus respiratorios de la familia *Coronaviridae* en quirópteros urbanos de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe**, previo a la obtención del título de **Magíster en Sanidad Animal**, de autoría de la estudiante **Gabriela Steffania Parra Rivadeneira**, con **cédula de identidad Nro. 1150129680**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Blgo. Jorge Isaac Armijos Rivera, PhD.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autoría

Yo, **Gabriela Steffania Parra Rivadeneira**, declaro ser autora del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**GABRIELA STEFFANIA
PARRA RIVADENEIRA**

Cédula de identidad: 1150129680

Fecha: 26 de marzo del 2024

Correo electrónico: gsparrar@unl.edu.ec

Teléfono: 0985083524

Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Titulación.

Yo, **Gabriela Steffania Parra Rivadeneira**, declaro ser la autora del Trabajo de Titulación denominado: **Detección de virus respiratorios de la familia *Coronaviridae* en quirópteros urbanos de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe**”, como requisito para optar por el título de **Magister en Sanidad Animal**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja, a los veinteséis días del mes de marzo del dos mil veinticuatro.

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**GABRIELA STEFFANIA
PARRA RIVADENEIRA**

Autora: Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

Cédula: 1150129680

Dirección: Balcón Universitario

Correo electrónico: gsparrar@unl.edu.ec

Teléfono: 0985083524

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director del Trabajo de Titulación: Blgo. Jorge Isaac Rivera, PhD.

Dedicatoria

Este trabajo va dirigido especialmente a mi pequeña y dulce hija, Ana Paula González Parra gracias por ser mi inspiración constante. Tu amor y paciencia han sido mi refugio durante este proceso de tesis. Este logro también es tuyo.

A mi mamá María Rivadeneira y mis abuelitos maternos Tutita y Puchito, quienes han sido pilares inquebrantables desde un principio, su apoyo y amor incondicional han sido un regalo invaluable, por el que estoy hoy celebrando este logro. A mis hermanos Joel y Camila, gracias por sus palabras de aliento y su comprensión durante los momentos desafiantes.

Al abogado Pablo González por saber comprender mis compromisos y por motivarme a alcanzar mis metas.

A mi querido padre, William Humberto Parra Garrido, aunque no estés presente físicamente, siento tu amor y sabiduría guiándome desde lo más profundo de mi corazón. Tu legado vive en cada paso que doy.

Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

Agradecimiento

Querido Dios y Santísima Virgen del Cisne, en este momento de gratitud, elevo mi corazón hacia ustedes por la fortaleza que me han brindado en los momentos difíciles, por la esperanza que han sembrado en mi corazón y por la fe que me ha permitido alcanzar este logro. Que su amor continúe iluminando mi camino y guiándome en cada nuevo capítulo.

Mis sinceros agradecimientos a los profesionales que hacen posible los posgrados en la Universidad Nacional de Loja, también agradezco infinitamente a las autoridades competentes de la Agencia AGROCALIDAD el Dr. Juan Freire por haberme dado la oportunidad de vincularme junto a ellos para el progreso de este trabajo. De la misma manera, a los profesionales de la Universidad Técnica Particular de Loja, el Blgo. Rodrigo Cisneros y el Blgo. Victor Romero por haber colaborado en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Dr. Jorge Armijos, director de mi trabajo de Titulación. Así mismo, gratifico la colaboración del Dr. Marlon Bravo.

Por último y no menos importante, quiero agradecerme, por creer en mí, por hacer todo este trabajo duro, por nunca renunciar. He superado desafíos, he crecido y he demostrado una notable determinación para enfrentar cualquier desafío que se presente en el futuro.

Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

Índice de contenidos

Portada	i
Certificación	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de Contenidos	vii
Índice de Tablas	x
Índice de Figuras	xi
Índice de Anexos	xii
1. Título	1
2. Resumen	2
Abstract	3
3. Introducción	4
4. Marco Teórico	6
4.1 Generalidades de los coronavirus	6
4.1.1 <i>Taxonomía de los coronavirus</i>	6
4.1.2 <i>Características morfológicas y estructurales</i>	6
4.1.3 <i>Interacciones de la proteína S y su receptor</i>	7
4.1.4 <i>Presencia Virus Respiratorios en animales</i>	7
4.2 SARS-CoV-2 a nivel mundial	8
4.2.1 <i>SARS-CoV-2 en el Ecuador</i>	10
4.2.2 <i>SARS-CoV-2 en animales domésticos y carnívoros salvajes</i>	11
4.2.3 <i>Expresión de ACE2 en animales</i>	11
4.2.4 <i>Variantes de SARS-CoV-2</i>	12
4.2.4.1 <i>Variantes de interés (VOI)</i>	13
4.2.4.2 <i>Variantes preocupantes (VOC) del SARS-CoV-2</i>	13
4.2.5 <i>Vectores u hospedadores</i>	14
4.2.5.1 <i>Coronavirus del pangolín</i>	14
4.2.5.2 <i>Coronavirus de civetas</i>	15
4.2.5.3 <i>Coronavirus del murciélago</i>	15
4.2.6 <i>Vías de transmisión</i>	15

4.2.7 Patogenia del SARS-CoV-2	16
4.2.8 Fisiopatología del SARS-CoV-2	17
4.2.9 Manifestaciones clínicas del COVID-19	17
4.3 Respuesta inmune	18
4.3.1 Funciones inmunitarias innatas.....	19
4.3.2 Funciones inmunitarias humorales.	19
4.3.3 Funciones de la inmunidad celular.	20
4.4 Técnicas de Diagnóstico	20
4.4.1 Tomografía computarizada torácica (CT).....	20
4.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).....	20
4.4.3 La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	21
4.4.4 Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interespaciadas (CRISPR).....	21
4.5 Otros Coronavirus Humanos (HCoV-NL63, -229E, -OC43 Y -HKU1)	23
4.5.1 Características morfológicas y estructurales	23
4.5.2 Receptores del dominio de unión RBD	24
4.5.3 Epidemiología de otros CoV.....	24
4.5.3.1 HCoV-229E.	24
4.5.3.2 HCoV-OC43.	24
4.5.3.3 HCoV-NL63.	25
4.5.3.4 HCoV-HKU1.....	25
4.5.4 Patogenia de otros Coronavirus Humanos	25
4.5.5 Mediadores de respuesta inmune	26
4.6 Control y prevención	26
4.7 Enfoque General sobre los Murciélagos.....	27
4.7.1 Taxonomía de los murciélagos	27
4.7.2 Características Morfológicas	28
4.7.3 Hábitat	29
4.7.4 Reproducción	30
4.7.5 Captura de murciélagos.....	30
4.7.5.1 Redes de niebla:	30
4.7.5.2 Equipos de sonido:.....	31
4.7.6 Identificación de especímenes	31
4.7.7 Toma de muestras y transporte de individuos	32

4.8 Especies Nativas Del Ecuador	32
4.8.1 Distribución de Murciélagos en Ecuador.....	33
4.9 Definición de Secuenciación	35
5. Metodología.....	36
5.1 Área de estudio	36
5.2 Diseño de estudio.....	36
5.3 Tipo de muestreo y tamaño de muestra	36
5.4 Métodos y técnicas	37
5.4.1 Captura e identificación de individuos.....	37
5.4.2 Toma y transporte de muestras.....	37
5.5 Extracción de ARN y Secuenciación.....	38
5.6 Análisis de datos e interpretación.....	39
5.7 Consideraciones éticas.....	39
6. Resultados.....	41
6.1. Frecuencia de infección relacionado al sars-cov-2 en murciélagos de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe.....	41
6.2. Frecuencia de infección al sars-cov-2 según su localidad.....	41
6.3. Frecuencia de sars-cov-2 en murciélagos con relación a la especie.....	42
6.4. Frecuencia de sars-cov-2 en murciélagos de acuerdo al sexo.....	42
6.5. Frecuencia de otros coronavirus (cov) en murciélagos.....	43
6.6. Análisis filogenético	43
7. Discusión.....	45
8. Conclusiones.....	50
9. Recomendaciones.....	51
10. Bibliografía.....	52
11. Anexos.....	77

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los murciélagos	27
Tabla 2. Diversidad de murciélagos en el Ecuador (géneros, especies y subespecie)	34
Tabla 3. Registro de murciélagos según las provincias del Ecuador.....	35
Tabla 4. Protocolo de qPCR para diagnóstico de Coronavirus	38
Tabla 5. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos de Loja y Zamora Chinchipe.	41
Tabla 6. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos según su localidad.	42
Tabla 7. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos con respecto a la especie.	42
Tabla 8. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos según el sexo.	43
Tabla 9. Presencia de otros CoV.....	43
Tabla 10. Matriz de identidad porcentual entre secuencias analizadas y el genoma de referencia.	44

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de medidas en murciélagos	32
Figura 2. Hoja nasal a) desarrollada, b) rudimentaria y c) alargada.....	32
Figura 3. Georreferencia del área de estudio y puntos de muestreo.....	36
Figura 4. Individuos capturados entre la provincia de Loja y Zamora Chinchipe.....	41
Figura 5. Árbol filogenético por el método Neighbor-Joining.....	44

Índice de Anexos

Anexo 1. Protocolo de identificación de especies en murciélagos.	77
Anexo 2. Protocolo para toma de muestras en murciélagos.	78
Anexo 3. Protocolo para captura de murciélagos.	79
Anexo 4. Certificado de traducción del Abstract.....	82

1. Título

Detección de virus respiratorios de la familia *Coronaviridae* en quirópteros urbanos de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe.

2. Resumen

Los coronavirus son una familia de virus que pueden causar enfermedades altamente patógenas y zoonóticas tanto en animales como en humanos. Uno de los miembros más conocidos de esta familia es el Coronavirus tipo 2 (*SARS-CoV-2*), virus responsable de la pandemia de COVID-19 que ha tenido impacto global sin precedentes. Los murciélagos son reconocidos como reservorios naturales de los coronavirus, lo que significa que estos animales pueden albergar y transmitir el virus de forma asintomática. Dada la capacidad de los coronavirus para mutar y evolucionar, es esencial llevar a cabo una vigilancia continua de la presencia y evolución del SARS-CoV-2 en poblaciones de murciélagos, ya que esto puede proporcionar información valiosa para la prevención de futuras pandemias y la protección de la salud pública. En Ecuador, existen escasos estudios relacionados a la aproximación de los reservorios naturales del SARS-CoV-2, ante esta situación, se estableció un estudio de carácter observacional y transversal, enfocado en identificar la presencia de SARS-CoV-2 y otros coronavirus en murciélagos. Siendo así, se capturó un total de 126 murciélagos como muestreo no probalístico (por conveniencia) provenientes de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. En esta investigación, hemos integrado enfoques moleculares como la técnica RT-qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa). Los resultados revelaron una frecuencia de infección por SARS-CoV-2 del 13,49 % en 4 especies distintas (*Desmodus rotundus*, *Anoura geoffroyi*, *Carollia perspicillata*, *Carollia sp*). Además, identificamos la presencia de otros coronavirus (CoV) en el 24,60 % de las muestras, con los virus (*HCoV-NL63*, *HCoV-HKU1*, *HCoV-229E*, *HCoV-OC43*). Finalmente, empleamos la técnica de secuenciación de genoma completo (*ILLUMINA*), evidenciando similitudes que varían entre el 57 % y el 78 % entre los genomas analizados y la secuencia de referencia para SARS-CoV-2 en humanos (NC_045512.2). La detección de similitudes genómicas entre los genomas analizados y la secuencia de referencia para SARS-CoV-2 en humanos destaca la importancia de comprender la diversidad viral en poblaciones de murciélagos, lo que puede tener implicaciones para la vigilancia epidemiológica y la comprensión de la posible transmisión zoonótica de coronavirus.

Palabras clave: Coronavirus; Transmisión inversa; RT-qPCR; SARS-CoV-2; murciélagos.

Abstract

Coronaviruses are a family of viruses that can cause highly pathogenic and zoonotic diseases in both animals and humans. One of the best-known members of this family is Coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), the virus responsible for the COVID-19 pandemic that has had unprecedented global impact. Bats are recognized as natural reservoirs of coronaviruses, which means that these animals can harbor and transmit the virus asymptotically. Given the ability of coronaviruses to mutate and evolve, it is essential to conduct ongoing surveillance of the presence and evolution of SARS-CoV-2 in bat populations, as this may provide valuable information for the prevention of future pandemics and the protection of public health. In Ecuador, there are few studies related to the approximation of the natural reservoirs of SARS-CoV-2. In view of this situation, an observational and cross-sectional study was established, focused on identifying the presence of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in bats. Thus, a total of 126 bats were captured as a non-probabilistic sampling (by convenience) from the provinces of Loja and Zamora Chinchipe. In this research, we integrated molecular approaches such as the RT-qPCR technique (Quantitative Polymerase Chain Reaction). The results revealed an infection frequency of 13.49 % with SARS-CoV-2 across four different species (*Desmodus rotundus*, *Anoura geoffroyi*, *Carollia perspicillata*, *Carollia* sp). Additionally, we identified the presence of other coronaviruses (CoV) in 24.60 % of the samples, including viruses (HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-229E, HCoV-OC43). Finally, we employed the full genome sequencing technique (ILLUMINA), revealing similarities ranging between 57 % and 78 % among the analyzed genomes and the reference sequence for SARS-CoV-2 in humans (NC_045512.2). The detection of genomic similarities between the analyzed genomes and the reference sequence for SARS-CoV-2 in humans underscores the importance of understanding viral diversity in bat populations, which may have implications for epidemiological surveillance and the understanding of potential zoonotic transmission of coronaviruses.

Keywords: Coronavirus; Reverse transmission; RT-qPCR; SARS-CoV-2; bats.

3. Introducción

Los coronavirus presentan en su genoma Ácido Ribonucleico (ARN) segmentado monocatenario que infectan a diversos animales de importante actividad económica (Gorbalenya *et al.*, 2020). Entre los virus que han causado pandemias mundiales se encuentran el Coronavirus Agudo Severo (SARS-CoV) causante de la Pandemia en el año 2002-2003, el Coronavirus del Oriente Medio (MERS-CoV) responsable de la pandemia en el año 2012 y el Coronavirus de tipo 2 (SARS-CoV-2) autor principal de la enfermedad con origen zoonótico COVID-19, que provocó la pandemia del año 2019-2020, por transmitirse de un huésped animal a un humano (Wong *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020a).

Los murciélagos son reservorios de diversos virus y poseen una amplia distribución geográfica, al igual que muchos huéspedes y patógenos virales humanos (Zhou *et al.*, 2020a). El SARS-CoV-2 es el agente de la nueva enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), misma que es una zoonosis asociada a los murciélagos, mamíferos que portan de forma natural este tipo de virus (Athni *et al.*, 2021). De acuerdo con Simmons y Cirranello (2020) en la Tierra hay más de 1,400 especies de murciélagos, los mismos que se clasifican en frugívoros (se alimentan de frutos), nectarívoros (se alimentan del néctar y polen de las flores), carnívoros (que cazan aves, ratones, ranas y pececillos) y finalmente vampiros (que se alimentan de sangre).

Varios estudios a nivel internacional han reportado la presencia de SARS-CoV-2 y otros coronavirus en murciélagos (Zhang *et al.*, 2020b; Dileepan *et al.*, 2021; Woo *et al.*, 2006b; Eloit *et al.*, 2020; Schlottau *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2016). En la actualidad se desconoce exactamente el origen del SARS-CoV-2, así como su introducción a la población humana. Desde su aparición, se han estudiado numerosas especies animales para identificar posibles reservorios o huéspedes intermediarios.

Existe una gran variedad de murciélagos insectívoros del género *Rhinolophus* relacionados con el SARS-CoV-2 como el *R. shameli* aislado en Camboya en el año 2010 (Delaune *et al.*, 2021), *R. pusillus* y *R. malayanus* descubiertos en China durante los años 2020 y 2019, respectivamente (Zhou *et al.*, 2021b), *R. acuminatus* encontrado en Tailandia en el año 2020 (Wacharapluesadee *et al.*, 2021) y *R. cornutus* aislada en Japón en el año 2013 (Murakami *et al.*, 2020). El genoma más cercano del SARS-CoV-2 transmitido por murciélagos sigue siendo el de *R. affinis*, RaTG13 descubierto en China en el año 2013 (Zhou *et al.*, 2020a; Rahalkar *et al.*, 2020), con un 96,1 % de identidad a nivel del genoma completo.

Desde su aparición en humanos, el SARS-CoV-2 ha evolucionado a través de mutaciones esporádicas y eventos de recombinación, que permiten al virus propagarse más ampliamente, o escapar a los anticuerpos neutralizantes (Jackson *et al.*, 2021; Rochman *et al.*, 2021).

Sin embargo, existe escasa información en el Ecuador sobre coronavirus en especies caracterizadas como reservorios naturales, por lo que, es importante cuestionarse si el origen está basado en el salto inter-especie a partir de la fauna silvestre para poder abordar la necesidad de incorporar procesos de investigación sistemáticos orientados a conocer las enfermedades emergentes que afectan a una especie determinada o aérea geográfica.

Numerosos coronavirus estudiados previamente han demostrado la capacidad de cruzar la barrera entre especies y transmitirse de animales a humanos. Por consiguiente, resulta crucial investigar si el SARS-CoV-2 comparte esta característica. Actualmente, se plantean varias hipótesis sobre su origen, entre las cuales destaca la posibilidad de un origen zoonótico, donde ciertos animales podrían desempeñar roles tanto de hospedadores naturales como intermediarios. Así mismo, se pone en duda la relación existente entre el contacto estrecho que poseen los humanos con otras especies animales domésticas. Con base a estos antecedentes, se planteó los siguientes objetivos: Detectar coronavirus relacionados con el síndrome respiratorio agudo severo en murciélagos de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. Para ello se determinó la transmisión de SARS-CoV-2 entre las especies.

4. Marco Teórico

4.1 Generalidades de los coronavirus

Los coronavirus (CoV) son una amplia familia de virus que producen diversas afecciones desde el resfriado común hasta enfermedades graves. Poseen una nucleocápside helicoidal y punta en forma de corona. Actualmente existen 39 especies (Organización Mundial de la Salud, 2020a). Entre los virus altamente patógenos y causantes de pandemias mundiales tenemos el Coronavirus Agudo Severo (*SARS-CoV*), el Coronavirus de Oriente Medio (*MERS-CoV*), el Coronavirus tipo 2 (*SARS-CoV-2*) autor principal de la enfermedad con origen zoonótico conocida como COVID-19 (Cui *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020a). Se estima que 6 coronavirus infectan a huéspedes humanos como el Coronavirus humano 229E (*HCoV-229E*), Coronavirus humano OC43 (*HCoV-OC43*), Coronavirus humano NL63 (*HCoV-NL63*), Coronavirus humano de HKU1 (*HCoV-HKU1*), Coronavirus Agudo Severo (*SARS-CoV*), Coronavirus de Oriente Medio (*MERS-CoV*) (Fehr y Perlman, 2015).

4.1.1. Taxonomía de los coronavirus

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV) (2020), los CoV se clasifican basándose en pruebas serológicas y moleculares. La mayoría de los coronavirus de tipo alfa y beta tienen como hospedadores a mamíferos, mientras que los coronavirus de tipo gamma generalmente infectan aves. Los coronavirus de tipo delta, descubiertos recientemente, se han encontrado tanto en aves como en cerdos (Khalil y Khalil, 2020; Woo *et al.*, 2012a). Además, dentro del género *beta*-coronavirus existen 4 linajes: A, B, C y D.

4.1.2 Características morfológicas y estructurales

Los coronavirus son un grupo de virus envueltos con genomas de ARN no segmentado, monocatenario y de sentido positivo (Schoeman y Fielding, 2019). En promedio su estructura genómica posee 30 kilobases (kb) y se encuentra rodeado por 4 proteínas estructurales: proteína de nucleocápside (N), proteína transmembrana (M), proteína de la envoltura (E) y la proteína de espiga (S) (Vlasova *et al.*, 2007).

Proteína N: al unirse al genoma del ARN del CoV, se encarga de la replicación del ARN vírico y da la respuesta del huésped a la infección vírica. Como se encuentra ubicada en el retículo endoplasmático (RE) colabora en el ensamblaje y la gemación (Chen *et al.*, 2020).

Glicoproteína S: facilita la unión viral a células susceptibles, provoca la fusión celular e induce anticuerpos neutralizantes. Los cambios en la glicoproteína S son responsables de la variedad de hospedadores de los coronavirus y del tropismo tisular (Wan *et al.*, 2020). Presenta 2 subunidades, la S1 posee actividad neutralizante y se asocia a receptores; la S2 media la fusión de las membranas virales y celulares (Hasoksuz *et al.*, 2002; Vlasova *et al.*, 2007).

Proteína M: convierte las membranas celulares en fábricas, donde los factores del virus y del huésped se unen para formar nuevas partículas víricas, es decir, favorece el ensamblaje y están dirigidas a las proximidades del aparato de Golgi (Neuman *et al.*, 2011).

Proteína E: es la más pequeña y se expresa abundantemente en el interior de la célula infectada durante el ciclo de replicación, se localiza en el compartimiento intermedio RE-Golgi, el lugar de tráfico intracelular, donde participa en el ensamblaje y la gemación viral. Además, es esencial para la liberación de viriones y está implicada en la patogénesis del virus (Schoeman y Fielding, 2019).

4.1.3 Interacciones de la proteína S y su receptor

Las interacciones entre la proteína S y su receptor inician con la adhesión inicial del virión a la célula huésped (Bosch *et al.*, 2003). Los sitios de dominio de unión al receptor (*RBD*) se encuentran en el N-terminal de S1 (MHV), y otros como (SARS- CoV y SARS- CoV-2) en el C-terminal de S1. La unión al receptor y el acceso al citosol de la célula huésped, se consigue mediante la escisión proteolítica ácido-dependiente de la proteína S por una catepsina, proteasa transmembrana serina 2 (*TMPPRS2*) u otra proteasa, seguida de la fusión de las membranas viral y celular (Wan *et al.*, 2020).

Según Li (2015) muchos coronavirus *alpha* (HCoV-229E, TGEV, PEDV, FIPV, CCoV) para ingresar a las células huésped emplean la aminopeptidasa N (APN), otros como HCoV-NL63, SARS-CoV, y el SARS-CoV-2 utilizan la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2).

4.1.4 Presencia Virus Respiratorios en animales

Desde tiempos remotos las enfermedades infecciosas han existido en la humanidad, causando infecciones severas provocadas por patógenos emergentes provenientes de animales, considerados como vectores zoonóticos. Así, por ejemplo: en diferentes estudios se han

detectado secuencias genómicas muy similares al virus de la diarrea epidémica porcina (*PEDV*) en murciélagos (LePan, 2020; Ismail *et al.*, 2001; Menachery *et al.*, 2015).

También se ha determinado que el virus de la peritonitis infecciosa felina (*FIPV*) provoca el desarrollo de una enfermedad letal denominada peritonitis infecciosa felina (*FIP*) que posee forma seca y húmeda (Tekes y Thiel, 2016).

Por otro lado, el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (*TGEV*) y la diarrea epidémica porcina (*PEDV*) reconocida en 1946, causan gastroenteritis graves en lechones jóvenes que provocan una morbilidad y mortalidad significativas. La industria ganadera se vio afectada por coronavirus bovinos (*BCoV*) y su infección se propagó a una variedad de rumiantes incluyendo alces, jirafas, ciervos y camellos (Alekseev *et al.*, 2008).

Otro ejemplo es el virus de la bronquitis infecciosa (*IBV*) que afecta al tracto urogenital de los pollos, causando enfermedad renal. La producción de huevos se reduce significativamente y fue el primer CoV notificado por Beaudette y Hudson en 1937 (Jackwood, 2012; Ismail *et al.*, 2001).

El CoV animal más estudiado es el virus de la hepatitis murina (*VHM*), que causa una variedad de afecciones en ratones, incluidas infecciones respiratorias, entéricas, hepáticas y neurológicas, fue identificado por primera vez por Cheever y sus colaboradores en 1949 (Perlman y Netland, 2009; Cheever *et al.*, 1949).

4.2 SARS-CoV-2 a nivel mundial

Wong y colaboradores (2020) mencionan que, en diciembre del 2019 se conocía que los coronavirus infectan a diversos vertebrados de importancia económica tales como aves, ganado bovino y porcino; además de animales salvajes como murciélagos, ratones, jirafas, ballenas, entre otros. Tyrrell y Bynoe (1965) describieron el primer caso de coronavirus humano (B814) a partir de un cultivo de órganos de tráquea embrionaria humana tomada de un escolar resfriado. Hamre y Procknow (1966) recuperaron 5 cepas del virus en cultivos de tejidos tomados de estudiantes de medicina resfriados en la misma época.

Por su lado, Almeida y Tyrrell (1967) examinaron la cepa prototipo HCoV 229E, y su morfología resultó ser idéntica a la de B814. Mediante la técnica de cultivo de órganos

posteriormente se recuperaron otras 6 cepas prototipo HoV OC43, así como 3 cepas consideradas antigénicamente no relacionadas con OC43 o 229E.

En la provincia china de Guangdong, durante el invierno de 2002 a 2003, apareció una forma inusual y mortal de neumonía, etiquetada como síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Esta enfermedad se extendió a Hong Kong a finales de febrero y, en cuestión de días, se propagó el virus sembrando brotes en Vietnam, Singapur, Canadá y otros lugares. El punto de aparición inicial del SARS-CoV en un reservorio animal fue en los mercados de animales vivos de Guangdong (Menachery *et al.*, 2015).

En el sur de China, una enfermedad respiratoria vírica apareció por primera vez en noviembre del 2002, misma que se propagó rápidamente a otros países, dando lugar a más de 8000 casos confirmados al final de la epidemia en junio de 2003 (Perlman y Netland, 2009). El agente etiológico se identificó como SARS-CoV, un *beta*-coronavirus zoonótico originado en murciélagos de herradura que posteriormente se adaptó para infectar al huésped intermediario civeta de palma y finalmente a los humanos (Li *et al.*, 2005c; Song *et al.*, 2005).

El coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (*MERS-CoV*) se aisló en 2012 del pulmón de un paciente de 60 años de edad que desarrolló neumonía aguda e insuficiencia renal en Arabia Saudita. Incluso el MERS-CoV se descubrió en frotis nasales de camellos dromedarios (reservorio), convirtiéndolo en uno de los virus más devastadores conocidos por el ser humano (Perlman y Netland, 2009).

En 2016 al sur de China, existió un brote a gran escala de una enfermedad causada por un coronavirus en murciélagos (*Bat-CoV*) relacionado con HKU2, que afectó a 24000 lechones causando el síndrome de diarrea aguda porcina CoV (Menachery *et al.*, 2015).

Aunque no se ha registrado ningún caso de SARS desde 2004, en una cueva de Yunnan (China) se descubrió una rica reserva genética de coronavirus de murciélagos relacionados con el SARS, lo que pone de relieve la necesidad de prepararse para una futura reemergencia.

Las especies de murciélagos relacionadas con el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (*SARS*) son *Rhinolophus affinis*, *Rhinolophus sinicus* y se distribuyen principalmente en China, Europa y África (Hu *et al.*, 2017).

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causante del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (*SARS-CoV-2*), se detectó en Wuhan-China el 31 de diciembre del 2019 (Wu *et al.*, 2020). El 12 de enero de 2020, China compartió la secuencia genética del nuevo coronavirus (Lu *et al.*, 2020). En poco tiempo se había propagado por todo el mundo y el 30 de enero del 2020 la Organización Mundial de la salud (*OMS*) informó oficialmente la epidemia de COVID-19 como una emergencia internacional (Gorbalenya *et al.*, 2020). Las infecciones por SARS-CoV-2 están ahora muy extendidas según el informe de situación epidemiológica (*SITREP*) en más de 210 países (Lu *et al.*, 2020).

La investigación para determinar el agente causal del COVID-19 fue tan exhaustiva que, para el 7 de enero de 2020, científicos del Centro Clínico de Salud Pública de Shanghai, asociado a la Universidad de Fudan, identificaron el patógeno responsable del COVID-19 y lo caracterizaron genómicamente (Liu *et al.*, 2020a). Científicos de Hong Kong, Japón, China, Tailandia y Estados Unidos, asociados a universidades e institutos públicos compartieron sus protocolos de detección a la OMS entre el 23 y 28 de enero de 2020 (Corman *et al.*, 2020).

Cuando se comparó el gen S del SARS-CoV-2 con el gen S del SARS-CoV, bat-CoV (As6526), bat-CoV (RaTG13), visón-CoV, y pangolín-CoV, se encontró que una similitud del 71,41 %, 68,17 %, 92,86 %, 30,89 %, y 90 %, respectivamente (Li *et al.*, 2020b).

4.2.1 SARS-CoV-2 en el Ecuador

Según la OMS (2020a) la expansión del brote de COVID-19 inició en Wuhan-China y se alertó desde inicios de 2020 a todos los países del mundo y a mediados de febrero llegó a Latinoamérica. En Ecuador, el primer caso confirmado venía de una adulta mayor ecuatoriana que llegó de España el 14 de febrero. Al momento del arribo no presentó ningún síntoma, pero días después presentó fiebre, malestar general, luego de realizar las pruebas pertinentes, dio positivo para COVID-19. Quince días después, el 13 de marzo, se convirtió en la primera fallecida por la enfermedad en territorio nacional. Aunque se la reportó el 29 de febrero del 2020 como primer caso en Ecuador (Periodista digital, 2021).

Mediante acuerdo Ministerial No 00126-2020 emitido el 11 de marzo de 2020 por la Ministra de Salud, se declara el Estado de Emergencia Sanitaria en el Sistema Nacional de Salud (Ministerio de Salud Pública, 2020).

La provincia más afectada fue Guayaquil, donde hospitales y funerarias no se abastecían con las personas fallecidas, los contagios en Guayas, Manabí, Santa Elena, El Oro y Los Ríos se iban acelerando. Los médicos luchaban contra un enemigo del que poco se sabía. Los contagios se incrementaron exponencialmente en provincias de la Sierra, sobre todo en Pichincha, cuya capital es Quito, encaminándose hacia Cuenca, Loja. Finalmente llegó al Oriente desde Zamora a Orellana (Periodista digital, 2021).

4.2.2 SARS-CoV-2 en animales domésticos y carnívoros salvajes

Existen algunos estudios experimentales realizados en animales para determinar la susceptibilidad al SARS-CoV-2, así como en una investigación se inoculó el virus vía intranasal demostrando que tanto los gatos como los hurones son muy susceptibles al SARS-CoV-2, mientras que los perros presentan una susceptibilidad baja (Shi et al., 2020). Los perros mapache fueron considerados anteriormente y actualmente como hospedadores puente a la infección. Sin embargo, los pollos, patos y cerdos son poco susceptibles a este nuevo virus (Meekins et al., 2020; Schlottau et al., 2020).

En otro trabajo se realizó una prueba de ELISA tipo Sandwich para detectar la presencia de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en ganado doméstico (vacas, caballos, ovejas (vaca, caballo, oveja y cerdo), aves de corral (pollo, pato y ganso), animales de compañía (perro y gato) y animales de experimentación (ratón, rata, conejo, cobaya y mono), sin embargo, ninguna de las muestras resultó positiva (Deng et al., 2020).

También en un estudio se realizó la inoculación experimental del coronavirus en ovejas para investigar su susceptibilidad al SARS-CoV-2, en donde los resultados indicaron que estos animales tienen una baja susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2. Desde su propagación en humanos, se han documentado saltos secundarios del SARS-CoV-2 de los humanos a múltiples poblaciones domésticas y salvajes de mamíferos. Comprender el grado de adaptación a estos huéspedes animales es fundamental para evaluar la amenaza que supone la propagación del SARS-CoV-2 adaptado de los animales a los humanos (Gaudreault et al., 2021).

4.2.3 Expresión de ACE2 en animales

Una especie que posee un receptor ACE2 corre el riesgo de infectarse con el SARS-CoV2 (Wei et al., 2021). Según los estudios de homología ACE2, la transmisión directa del SARS-CoV-2 del murciélago al ser humano es poco probable. Sin embargo, la rápida adaptación de un CoV similar al SARS de los murciélagos en diferentes especies de mamíferos

de alto riesgo comparte una buena homología que podría permitir la unión con receptores ACE2 similares a los humanos (Wei *et al.*, 2021, Khan *et al.*, 2021).

El ACE2 se expresa en tejidos como el riñón y el hígado en gran medida. Los gatos como los hurones expresan ACE2 en los pulmones, mientras que el perro y el gato lo expresan en la piel (Shi *et al.*, 2020). Existen especies conocidas que por su falta de susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 presentan mutaciones no conservativas en varios residuos de aminoácidos de ACE2.

Las familias Primates, Cricetidae, Bovidae, y Cetacea presentan aminoácidos críticos que tienen la capacidad de unión con el RBD del SARS-CoV-2 (Luan *et al.*, 2020b). El análisis genético de la secuencia ACE2 y TMPRSS2 ha sugerido que los monos de la sabana (*Chlorocebus sp.*) se consideren como huéspedes susceptibles a la infección por SARSCoV-2, con posibilidad de infecciones bidireccionales con los humanos (Sharun, *et al.*, 2021).

En un estudio realizado por Damas y colaboradores (2020), se comparó la capacidad de unión de ACE2 del SARS-COV2 en diversos animales que incluye especies de cetáceos (12), roedores (7), cérvidos (3), primates lemuriformes (3), junto con el oso hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*), el oso melero u oso hormiguero amazónico (*Tamandua tetradactyla*) y el colobo de Angola (*Colobus angolensis*).

El análisis genómico identificó que el SARS-CoV-2 está estrechamente relacionado con los CoV derivados de animales salvajes, entre ellos *Paguma larvata* (civeta de palma enmascarada), *Paradoxurus hermaphroditus* (civeta palmera asiática), *Aselliscus stoliczkanus* (murciélago tridente de Stoliczka) y *Rhinolophus sinicus* (murciélago de herradura rufo chino) (Li *et al.*, 2020b; Sharun, *et al.*, 2021).

4.2.4 Variantes de SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 ha mutado constantemente durante el transcurso de la pandemia, lo que dio como resultados variantes que son diferentes del virus SARS-CoV-2 original. En los últimos meses del 2020 aparecieron diversas variantes del SARS-CoV2 que suponen un alto riesgo para la salud pública mundial. Estas variantes se clasifican en Variantes de Interés (VOI) y Variantes Preocupantes (VOC) con el fin de priorizar la vigilancia y la investigación a escala mundial (Organización Mundial de la Salud, 2019a).

Una mutación adaptativa localizada en el dominio RBD del SARS-CoV-2 denominado (Y453F), se ha detectado en más 200 granjas de visones, se especula que las poblaciones con COVID-19 transmitieron el SARS-CoV-2 a visones en los Países Bajos en abril del 2020. Posteriormente, el virus asociado a los visones (miSARS-CoV-2) se propagó a los humanos (Bayarri et al., 2021). Hallazgos recientes indican que los animales de compañía como perros y gatos también son susceptibles a las variantes de SARS-CoV-2 identificadas en seres humanos (Ferasin *et al.*, 2021).

Los primeros casos conocidos de infección por SARS-CoV-2 con la variante de Reino Unido (B.1.1.7) fueron en un gato doméstico de pelo corto y un perro labrador negro que convivían en el mismo hogar Texas-Estados Unidos (Mallapaty, 2020; Eiros y Hernández, 2022).

Por lo tanto, se necesitan más estudios para evaluar si las nuevas variantes de SARS-CoV-2 son más transmisibles o peligrosas en animales. También se ha especulado con la posibilidad de que los gatos y otros mamíferos acaben convirtiéndose en huéspedes de mantenimiento del SARS-CoV-2 tras la propagación, contribuyendo así a complicar a complicar el panorama epidemiológico (Bosco *et al.*, 2020, Franklin y Bevins, 2020).

4.2.4.1 Variantes de interés (VOI)

Las VOI poseen marcadores genéticos específicos que afectan a la transmisibilidad viral, virulencia, la reducción de la neutralización por anticuerpos obtenidos mediante infección natural o la vacunación, la capacidad de eludir la detección, o una disminución de la eficacia de la terapéutica o la vacunación. Entre ellos *Epsilon* (B.1.427 y B.1.429); *Zeta* (P.2); *Eta* (B.1.525); *Theta* (P.3); *Lota* (B.1.526); *Kappa* (B.1.617.1), *Lambda* (C.37) y *Mu* (B.1.621) (CDC, 2021; Eiros y Hernández, 2022).

4.2.4.2 Variantes preocupantes (VOC) del SARS-CoV-2

Alfa (linaje B.1.1.7). Descrita en el Reino Unido, presenta 17 mutaciones (8 mutaciones en la proteína Spike- Δ 69-70 deleción, Δ 144 deleción, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H) en el genoma viral. La mutación N501Y en la proteína S, muestra un aumento de la afinidad de la proteína por los receptores ACE 2 [35,36] receptores ACE 2 (Volz *et al.*, 2021; Galloway *et al.*, 2020).

Beta (linaje B.1.351 o GH501Y·V2). Detectada por primera vez en Sudáfrica en octubre de 2020 y fue responsable de la segunda oleada de infecciones por COVID-19. Nueve mutaciones (L18F, D80A, D215G, R246I, K417 N, E484K, N501Y, D614G y A701V) en la proteína S, tres mutaciones (K417 N, E484K y N501Y) situadas en el dominio de unión al receptor (RBD) aumentan la afinidad de unión a los receptores ACE (Tegally, 2021).

Gamma (linaje P.1 o GR/501Y·V3). Identificada en diciembre de 2020 en Brasil, presenta diez mutaciones en la proteína S (L18F, T20 N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027IV1176, K417T, E484K y N501Y) con tres mutaciones (L18F, K417 N, E484K) en el RBD (CDC, 2021; Tegally, 2021).

Delta (linaje B.1.617.2). Identificada inicialmente en diciembre de 2020 en India, fue responsable de la mortífera segunda oleada de COVID-19. Alberga diez mutaciones (T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) en la proteína S [34,38]. Su sublinaje asignado como AY.1 (Delta Plus) detectado en la India tiene una mutación adicional (K417N) en la RBD (Jacob *et al.*, 2021).

Ómicron (B.1.1.529). Informada por primera vez en Sudáfrica en noviembre de 2021 y se extendió por todo el mundo convirtiéndose en la variante más dominante, incluida la de la India. Posee al menos 50 mutaciones, 30 de ellas en el gen S. Tiene una alta transmisibilidad con escape del gen S en los kits de diagnóstico RT-PCR (CDC, 2021; Organización Mundial de la Salud, 2019a).

4.2.5 Vectores u hospedadores

Los coronavirus son conocidos por su capacidad de saltar la llamada "barrera de especies" que facilita la transmisión de patógenos entre especies diferentes (Zhang y Holmes 2020b; Dhama *et al.*, 2021). En general, los animales domésticos también pueden desempeñar un papel como huéspedes intermediarios que permiten la transmisión del virus (Chan *et al.*, 2020).

4.2.5.1 Coronavirus del pangolín.

El pangolín es un animal que se encuentra en peligro de extinción, se han aislado de pangolines enfermos coronavirus que presentaban un parecido con el CoV-2 del SARS (Dimonaco *et al.*, 2020). Los pangolines pueden actuar como huéspedes naturales de

betacoronavirus que tienen el desconocido potencial para infectar a los seres humanos (Liu *et al.*, 2020a).

También se informó de que el virus SARS-CoV-2 no procedía directamente de los pangolines, no obstante, el genoma del SARS-CoV-2 comparte una similitud genómica del 90,32 % con coronavirus de pangolín. En definitiva, es probable que surjan nuevos coronavirus periódicamente en los seres humanos dada la alta prevalencia y la amplia distribución de los coronavirus, la gran diversidad genética y la frecuente recombinación de sus genomas, y el creciente nivel de interacción humano-animal (Li *et al.*, 2020b).

4.2.5.2 Coronavirus de civetas.

Las civetas de palma enmascaradas que no habían estado expuestas a mercados de animales vivos dieron negativo en las pruebas de detección del SARS-CoV, lo que implica que las civetas de palma sirven de huésped amplificador intermedio, pero no de reservorio natural del SARS-CoV. La similitud genómica con coronavirus de civetas resultó ser del 99,8 % (Cheng *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2020).

4.2.5.3 Coronavirus del murciélago.

Se considera que los murciélagos son el principal reservorio natural de Coronavirus. El murciélago de herradura perteneciente al género *Rhinolophus* se considera el reservorio de CoV similares al SARS-CoV (Watanabe *et al.*, 2010). El genoma del SARS-CoV-2 comparte una similitud genómica del 96,2 % con coronavirus de murciélago. Esto indica la posibilidad de que este nuevo virus pueda haberse originado de murciélagos de forma similar a sus predecesores, MERS-CoV y SARS-CoV (Zhou *et al.*, 2020a). Se descubrió que una mutación en la proteína N y la proteína S del SARS-CoV-2 puede apoyar aún más la hipótesis de que el SARS-CoV-2 se originó en murciélagos tras adquirir la capacidad de infectar a humanos tras una serie de mutaciones. La secuenciación y el análisis del SARS-CoV de murciélago está estrechamente relacionado con el SARS-CoV de humanos y civetas (Benvenuto *et al.*, 2020).

4.2.6 Vías de transmisión

El COVID-19 se puede propagar a través de gotas respiratorias cuando una persona infectada tose, estornuda o habla, y esas partículas son inhaladas por otra persona cercana. Además, el virus se puede propagar al tocar una superficie o un objeto contaminado con el virus y luego tocarse la boca, la nariz o los ojos (Holmes *et al.*, 2021).

También se ha registrado la transmisión del virus por pequeñas partículas llamadas aerosoles que permanecen en el aire durante períodos prolongados de tiempo y se inhalan (Li *et al.*, 2020b). El SARS-CoV-2 y el SARS-CoV-1 tienen una estabilidad similar. Ambos virus pudieron detectarse en aerosoles hasta 3 horas, hasta 4 horas en cobre, hasta 24 horas en cartón y hasta 2 o 3 días en plástico y acero inoxidable, al igual que otros CoV, es sensible a los rayos ultravioleta y al calor (Ong *et al.*, 2020).

No hay informes científicos con evidencia actual de que las personas puedan contraer COVID-19 a través del agua potable o que la manipulación o el consumo de alimentos pueda propagar el COVID-19. Se debe seguir las normas de inocuidad y seguridad de los alimentos al manipular y lavar productos frescos (Centers for Disease Control and Prevention, 2019b).

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (2022a) indican que las personas pueden transmitir el virus del SARS-CoV-2 a los animales, sobre todo si mantienen un contacto estrecho. Sin embargo, el riesgo de que los animales transmitan el COVID-19 a las personas se considera bajo. Aunque las pruebas actuales sugieren un bajo riesgo de animales domésticos y de compañía, no se puede descartar la posibilidad de que los animales domésticos actúen como reservorios víricos del SARS-CoV-2 (Hobbs y Reid, 2020). Esto exige la aplicación de estrategias de "Una sola salud" que impliquen la ampliación de la vigilancia epidemiológica en curso a las poblaciones animales pertinentes (Ferasin *et al.*, 2021; WHO, 2021b).

Las investigaciones genéticas y epidemiológicas identificaron la ocurrencia de transmisión visón-humano en al menos dos trabajadores de una granja de visones que se han contagiado del virus. Este fue el primer caso de sospecha de transmisión de animal a humano del SARS-CoV-2 notificado en el mundo (Enserink, 2020; Oude *et al.*, 2020). La susceptibilidad de los visones al SARS-CoV-2 no fue una sorpresa, ya que están estrechamente emparentados con los hurones (Richardson *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020).

4.2.7 Patogenia del SARS-CoV-2

El periodo de incubación medio (el tiempo transcurrido desde la exposición hasta la aparición de los síntomas) para la COVID-19 es de aproximadamente 5 (2-7) días (Lauer *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020a). El virus ingresa a través de la membrana mucosa en la nariz, boca o garganta y se une a la proteína ACE2, que se encuentra en la superficie de las

células humanas. Una vez que el virus se une a esta proteína, se fusiona con la membrana celular y libera ARN viral en las células huésped (Mousavizadeh y Ghasemi, 2021).

El SARS-CoV-2 se replica en las células huésped, lo que conduce a la muerte celular y la inflamación de los tejidos. A medida que el virus se replica, se liberan proteínas virales y los productos de estas proteínas desencadenan una respuesta inmunitaria del huésped (Shah et al., 2020). Es por eso que la prevención de la infección por SARS-CoV-2 es crucial para disminuir el impacto de la enfermedad COVID-19 (Mousavizadeh y Ghasemi, 2021).

4.2.8 Fisiopatología del SARS-CoV-2

Pueden estar implicados varios mecanismos patogénicos potenciales, como la coagulopatía, la disfunción endotelial y la liberación excesiva de citoquinas proinflamatorias. La disfunción endotelial causada por la infección, activa la generación excesiva de trombina e inhibe la fibrinólisis, lo que conduce a la hipercoagulabilidad. La linfopenia es frecuente en pacientes con COVID-19 (Xu et al., 2020). En los pacientes que mueren de insuficiencia respiratoria asociada a COVID-19, el patrón histológico en pulmón periférico era el daño alveolar difuso con infiltración perivascular de células T9. Los microtrombos capilares alveolares eran frecuentes, con un alto nivel de crecimiento de nuevos vasos (angiogénesis intususceptiva) (Huang *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2020).

SARS-CoV-2 se une a ACE2 mediante la proteína S e infecta las células y a su vez es necesaria la activación por TMPRSS2 como proteasa (Hoffmann et al., 2020). Después de que el virus entre en la célula huésped empieza la replicación y transcripción del genoma del coronavirus que tienen lugar en las membranas citoplasmáticas e implican procesos coordinados de síntesis de ARN tanto continuos como discontinuos, mismo que está compuesto por hasta 16 subunidades virales y varias proteínas celulares (Mousavizadeh y Ghasemi, 2021).

4.2.9 Manifestaciones clínicas del COVID-19

De acuerdo con Team (2020) los síntomas más habituales de la COVID-19 son fiebre, escalofríos, fatiga, tos seca y cansancio. Algunos síntomas menos frecuentes son pérdida del gusto o el olfato, congestión nasal, conjuntivitis, dolor de garganta, dolor de cabeza, dolores musculares o articulares, diferentes tipos de erupciones cutáneas, náuseas o vómitos, diarrea, irritabilidad, merma de la conciencia, ansiedad, depresión, trastornos del sueño, accidentes cerebrovasculares, inflamación del cerebro, estado delirante y lesiones neurales, pérdida de

apetito, confusión, dolor u opresión persistente en el pecho, temperatura alta (arriba de 38° C). A continuación, se describe algunos signos con respecto al órgano afectado descritos por Docherty *et al.*, (2020).

- **Corazón y vasos sanguíneos.** Hipotensión que puede llegar al shock, taquicardia, arritmias, edema, palidez, frialdad.
- **Cerebro y sistema nervioso.** Cefalea, confusión, crisis convulsivas, alucinaciones, estupor, coma.
- **Pulmones.** Tos, polipnea, cianosis, trastornos de la ventilación perfusión, arritmias respiratorias, disnea.
- **Renal.** Disminución de la diuresis que puede llegar a la anuria.
- **Hepático.** Ictericia, hepatomegalia.
- **Hematología.** Alteraciones de la coagulación sanguínea caracterizada por hemorragia a diferentes niveles.

4.3 Respuesta inmune

Wang y colaboradores (2020b) indican que el virus una vez que accede al interior de la célula diana, es reconocido por completo por el sistema inmunitario del huésped, provocando la respuesta inmunitaria innata o adaptativa (di Mauro *et al.*, 2020). Se detectan anticuerpos IgA, IgG e IgM específicos del SARS-CoV tras el inicio de los síntomas en diferentes momentos en pacientes infectados (Guo *et al.*, 2020).

Los fagocitos, como los macrófagos, son capaces de identificar la presencia del SARS-CoV-2 mediante la activación de receptores tanto endosómicos (como TLR3 y TLR7/TLR8) como citosólicos (MDA-5 y RIG-1). Este reconocimiento inicia una serie de respuestas inmunitarias, incluyendo la liberación de citocinas y del interferón tipo 1 (IFN-1). Estas moléculas desencadenan un estado antiviral en las células, estimulan la actividad de las células asesinas naturales (NK) para eliminar células infectadas, y favorecen la maduración de las células dendríticas, que a su vez activan a los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Zhang *et al.*, 2020a; di Mauro *et al.*, 2020).

Los linfocitos T CD4+ colaboran con los linfocitos CD8+ en la eliminación de células infectadas y también orientan a los linfocitos B para generar anticuerpos específicos contra los antígenos del SARS-CoV-2. En este punto, los coronavirus emplean diversas estrategias de evasión, como a) eludir el reconocimiento del sistema inmunitario del huésped mediante la

formación de vesículas de doble membrana, b) inhibir la señalización de receptores que activan la respuesta antiviral del interferón tipo 1 (IFN-1) (como TLR3, TLR7/TLR8, MDA-5 y RIG-1) y de otras citocinas (como IFNRA y TNF-R), y c) evitar los mecanismos de respuesta de los linfocitos T mediante la inducción de apoptosis y la muerte celular (Kumar *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020b).

4.3.1 Funciones inmunitarias innatas.

Las células epiteliales del sistema respiratorio son las primeras en ser atacadas, ya que expresan receptores de reconocimiento de patrones (RRP) como los receptores tipo Toll (TLR-7 y TLR-8), la proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma (MDA5) y la proteína inducible por ácido retinoico del gen I (RIG-I) (Li *et al.*, 2020b; Shah *et al.*, 2020).

Los macrófagos alveolares, macrófagos diferenciados y neutrófilos reclutados realizan la fagocitosis de células infectadas, cuerpos apoptóticos que contienen virus, partículas virales y virones. Además, liberan citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, INF α , INF β , TNF α , G-CSF y GM, las cuales contribuyen a la eliminación viral pero también pueden provocar daño alveolar difuso y edema pulmonar (Konradt & Hunter, 2018).

La acumulación de estas células en el pulmón resulta en una alta producción de citocinas proinflamatorias, lo que conduce a la tormenta de citocinas, caracterizada por la liberación descontrolada de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , G-CSF, GM-CSF y MCP-1 (CCL-2), lo cual puede provocar síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), fallo multiorgánico y aumento de los parámetros inflamatorios (Wang *et al.*, 2020; Katze, 2012; Nenasheva *et al.*, 2020)

4.3.2 Funciones inmunitarias humorales.

Esta mediada por los linfocitos B que reconocen los antígenos de SRAS-CoV, se provoca una respuesta precoz contra la proteína N, mientras que los anticuerpos contra la proteína S podrían detectarse a los 4-8 días de la aparición de los síntomas iniciales (Shah *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos por Zhang y su equipo (2020a) indican que la mediana del tiempo requerido para la seroconversión de IgM fue de 12 días, mientras que para IgG fue de 14 días. Observaron que, de 173 individuos estudiados, se produjo seroconversión en el 82,7 % de ellos para IgM (143 de 173), mientras que solo el 64,7 % mostró seroconversión para IgG (112 de 173). Por otro lado, Wang y sus colegas (2020b) observaron una disminución

significativa en los linfocitos B en la sangre periférica de pacientes con neumonía moderada y severa, lo que podría sugerir un papel importante en la respuesta contra el virus.

4.3.3 Funciones de la inmunidad celular.

Los linfocitos CD4+, especialmente el subtipo 1, desempeñan un papel crucial en la erradicación de las células infectadas. Estos linfocitos son responsables de la producción de IL-2, IL-12 e INF γ , siendo la IL-2 fundamental para la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y los linfocitos T CD8+ (Astuti y Ysrafil, 2020). La reacción de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) es crucial para alcanzar una resolución completa de la infección causada por el SARS-CoV-2 (Janice *et al.*, 2012). Además, los CTLs liberan moléculas señalizadoras como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el interferón gamma (INF γ). Este último, a su vez, promueve la producción de interleucina 12 (IL-12) por parte de las células dendríticas y facilita la diferenciación de los linfocitos T CD8+ inmaduros en células citotóxicas (Channappanavar *et al.*, 2014).

4.4 Técnicas de Diagnóstico

El Diagnóstico clínico de COVID-19 se basa principalmente en la historia epidemiológica, manifestaciones clínicas y análisis de laboratorio mediante una variedad de métodos (Frustagli, 2020). Entre algunos métodos para detección temprana está la toma de muestras con hisopados nasofaríngeas, orofaríngeas, sangre o aspirados bronquiales (Chan *et al.*, 2020; Avetyan *et al.*, 2021).

4.4.1 Tomografía computarizada torácica (CT).

Fue una de las primeras técnicas de imagen en vivo usadas para determinar enfermedades por neumonía. Tiene una sensibilidad del 69 % (Chan *et al.*, 2020).

4.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

Exige una alta calidad de muestras que contengan ARN del SARS-CoV-2. Se basa en la detección cualitativa (positiva o negativa) y simultánea de genotipos del virus, en donde existe una amplificación de una región específica del gen (N, S y E), utilizando oligonucleótidos que detectan el ADN viral y sondas específicas que permiten de manera simultánea su diferenciación por genotipos específicos de alto riesgo (Khalil y Khalil, 2020). Se considera el método más recomendado por la OMS y los CDC. Tiene una sensibilidad del 91 % (Chan *et al.*, 2020; Corman *et al.*, 2020).

El análisis bioinformático del coronavirus SARS-CoV-2 determinan genes objetivos como ORF1ab, gen S y gen N, los cuales demuestran un nivel de identidad de secuencia que predice más del 99,4 % de detección de todas las secuencias de SARS-CoV-2 de buena calidad y que son publicadas en (*GISAID*) Iniciativa Mundial para Compartir Todos los Datos sobre la Gripe (Novelli, 2020; Montesinos *et al.*, 2020).

4.4.3 La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

Es una amplificación de ácidos nucleicos basada en la PCR, amplifica específicamente la secuencia diana de forma muy eficaz y rápida en condiciones isotérmicas. Se basa en el uso de cuatro a seis cebadores diferentes que reconocen cuatro o seis regiones del gen diana y la ADN polimerasa Bst. El producto amplificado puede identificarse visualmente añadiendo un colorante fluorescente (Broughton *et al.*, 2020).

4.4.4 Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interespaciadas (CRISPR)

Requiere ARN guía que se une a la secuencia complementaria diana y la enzima nucleasa escinde en el sitio preciso. Esta técnica ultrasensible se dirige al gen de la envoltura del SARS-CoV-2 y los resultados pueden analizarse por fluorescencia o/mediante el método de flujo lateral (Broughton *et al.*, 2020).

4.4.5 Prueba de amplificación de ácidos nucleicos basada en cartuchos y TrueNAT (CBNAAT).

Es la técnica de amplificación totalmente automatizada que utiliza la tecnología GeneXpert para el diagnóstico de la tuberculosis (TB). Esta técnica se dirige al gen E y al gen N2 del SARS-CoV2 para el cribado y la confirmación, respectivamente. Otra prueba basada en ácidos nucleicos denominada TrueNAT, dirigida al gen E para y el gen RdRp para la confirmación de COVID-19 (Wang *et al.*, 2020a).

4.4.6 Ensayos serológicos

Se basa en la identificación de anticuerpos, la presencia de anticuerpos IgM indica exposición reciente a la infección viral, mientras que los anticuerpos IgG indican exposición previa a la infección vírica por SARS-CoV-2 (Wang *et al.*, 2020a).

- **Kits de prueba rápida:** el fundamento subyace en el inmunodiagnóstico de anticuerpos desarrollados en respuesta a la infección vírica (IgG e IgM). Aunque puede producir resultados falsos negativos o positivos, debido a una inadecuada manipulación (Long *et al.*, 2020).

- **ELISA directo:** los anticuerpos específicos del antígeno pueden detectarse en un paciente después de 3 a 6 días, y la IgG podría detectarse en las últimas etapas de la infección. La validación preliminar de este modelo ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad en la detección de la infección por SARS-CoV-2 (Bundschuh *et al.*, 2020).
- **ELISA indirecto:** la prueba utiliza una placa ELISA recubierta con la proteína nucleocápside recombinante del SARS-CoV-2 para detectar la presencia de IgG humana contra el antígeno COVID-19 recombinante (Bundschuh *et al.*, 2020).
- **Inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA):** la detección se basa en la reacción en la que las enzimas utilizadas para la reacción inmunoquímica convierten el sustrato de quimioluminiscencia en un producto de reacción, que emite un fotón de luz en lugar del desarrollo del color (Infantino *et al.*, 2020)
- **Inmunoensayo de flujo lateral:** se basa en el principio de las reacciones antígeno-anticuerpo en el que la muestra que se va a analizar se coloca en un dispositivo y los resultados se muestran en 5-15 minutos. Es de fácil realización. Tiene una sensibilidad del 70 % (Montesinos *et al.*, 2020).

Existen varios kits ELISA disponibles para el diagnóstico de la infección por SRAS-CoV-2 mediante el análisis de anticuerpos IgM e IgG (Long *et al.*, 2020). En los pacientes sintomáticos de COVID-19, la duración media para la detección de anticuerpos IgM e IgA fue de 5 días y la de IgG se detectó en 14 días. La eficacia de detección de IgM ELISA fue superior que la de RT-qPCR después de 5,5 días de la aparición de los síntomas (Bundschuh *et al.*, 2020).

4.4.7 Ensayo en el punto de atención POC

Se realiza junto a la cama del paciente o cerca del lugar donde éste se encuentra, tiene un tiempo de respuesta rápido que facilita diagnóstico de la enfermedad COVID-19, el seguimiento y el cambio en la gestión de la atención al paciente. Existen 233 ensayos Point-of-Care (POC) disponibles comercialmente para detectar antígenos del SARS-CoV-2 como la proteína S o anticuerpos contra antígenos virales (Kozel y Burnham, 2017).

4.4.8 COVID-19 Ag Respi-Strip, ensayo inmunocromatográfico (ICT)

COVID-19 Ag Respi-Strip representa un prometedor ensayo rápido del antígeno SARS-CoV-2 para el diagnóstico de primera línea del COVID-19, a partir de muestras nasofaríngeas.

Está dirigido a la región nucleoproteína altamente conservada del SARS-CoV-2 y capaz de detectar los antígenos en 15 minutos con una sensibilidad y especificidad globales del 57,6 % y 99,5 %, respectivamente (Mertens *et al.*, 2020).

4.5 Otros Coronavirus Humanos (HCoV-NL63, -229E, -OC43 y -HKU1)

Los CoV endémicos a nivel mundial (HCoV-NL63, -229E, -OC43 y -HKU1) causan frecuentes infecciones respiratorias leves. En el caso del HCoV-OC43, se sospecha que se trata de animales ungulados y, en el caso del HCoV-229E, existen pruebas de que esta variante vírica se transmitió originalmente de los murciélagos a los humanos a través de los camellos (Xin *et al.*, 2019; Al-Sharif *et al.*, 2021). En algunos betacoronavirus, incluidos el HCoV-OC43 y el HCoV-HKU1, también se observan proyecciones más cortas de la proteína hemaglutinina-esterasa (HE) (Li, 2015a).

4.5.1 Características morfológicas y estructurales

Los tamaños del genoma son de aproximadamente 27,5 kb para HCoV-229E y HCoV-NL63, y de más de 30 kb para HCoV-OC43 y HCoV-HKU1, aunque el SARS-CoV-2 tiene un tamaño establecido de 30 kb. Debido a que el ARN genómico alberga una estructura 5'-cap y una cola 3'-poliadenilato, puede actuar directamente como un ARN mensajero (ARNm) que codifica la replicasa viral. Además, el genoma también sirve como molde para la replicación del ARN y el genoma se empaqueta en viriones progenie (Malik, 2020; Ding *et al.*, 2021).

Hay dos regiones no traducidas (UTR) que flanquean la región codificante. La 5'-UTR tiene 292, 210, 286 y 205 nucleótidos de longitud en HCoV-229E, -OC43, -NL63 y -HKU1, respectivamente, y contiene una secuencia líder (~70 nucleótidos de longitud) en su 5'-terminal. En el otro extremo del genoma, el 3'-UTR tiene una longitud de 462, 288, 287 y 281 nucleótidos en HCoV-229E, -OC43, -NL63 y -HKU1 respectivamente, y contiene una secuencia octamérica altamente conservada de ~70 nucleótidos aguas arriba de la cola poli(A) (Cui *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2020).

En concreto, el HCoV-229E codifica dos proteínas accesorias 4a y 4b; el HCoV-OC43 codifica tres proteínas accesorias ns2a, ns12.9 (también conocida como ns5a) y la proteína I (también conocida como proteína N2 o proteína ORF interna N); el HCoV-NL63 codifica una única proteína accesoria 3; y el HCoV-HKU1 codifica dos proteínas accesorias: la proteína 4 y la proteína (Yuan *et al.*, 2015). De hecho, el gen accesorio que codifica la proteína I de HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 se codifica internamente de los genes N. n particular, un estudio reciente

informó de que la expresión ectópica de HCoV-NL63 PLP2 induce la degradación proteasomal de p53, inhibiendo así la producción dependiente de p53 de IFN tipo I y la respuesta inmune innata (Friedman *et al.*, 2018; Xin *et al.*, 2019).

4.5.2 Receptores del dominio de unión RBD

El dominio de unión al receptor (RBD) de S1 varía entre los distintos coronavirus. Los RBD de HCoV-229E, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 se localizan en la región C-terminal pero no en los dominios N-terminal de las respectivas subunidades S1 (Wan *et al.*, 2020; Hasoksuz *et al.*, 2002). Los receptores proteicos de cada coronavirus, aminopeptidasa N (APN) para el HCoV-229E, la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) para el MERS-CoV, y ACE2 para el HCoV-NL63, el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 (Zeng *et al.*, 2018; Ou *et al.*, 2017).

Por otra parte, el HCoV se une a proteínas celulares y carbohidratos de la membrana plasmática como receptores. Por otro lado, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 emplean receptores basados en glicanos que llevan ácido siálico 9-O-acetilado (Ding *et al.*, 2021).

4.5.3 Epidemiología de otros CoV

4.5.3.1 HCoV-229E. El coronavirus humano 229E fue aislado por primera vez en 1966, procede de murciélagos hipospéridos africanos y adopta a los camélidos como huéspedes intermediarios. El periodo de incubación es de aproximadamente 2-5 días, seguido de una enfermedad que dura entre 2 y 18 días. Los síntomas incluyen dolor de cabeza, secreción nasal, estornudos, dolor de garganta y malestar general. Las características clínicas pueden distinguirse de las infecciones de las vías respiratorias causadas por otros patógenos como el virus de la gripe A. Tiende a ser epidémico durante el invierno en los países de clima templado, y las pruebas de una cepa de laboratorio del HCoV-229E sugieren que es relativamente estable en el medio ambiente (Susan, 2018a).

4.5.3.2 HCoV-OC43. El coronavirus humano OC43 fue descubierto por primera vez en 1967, no tiene reactividad serológica cruzada con el HCoV-229E. Sin embargo, los pacientes infectados manifiestan dolor de garganta. Se asocia generalmente a infecciones leves de las vías respiratorias superiores, aunque también se ha demostrado que tiene propiedades neuroinvasoras (Schirtzinger *et al.*, 2022). Estudios in vivo en ratones han demostrado que el HCoV-OC43 puede infectar neuronas y causar encefalitis. También se ha demostrado que el virus causa infecciones persistentes en líneas celulares neuronales humanas. Desde el primer aislamiento en la década de 1960, se han identificado siete genotipos (A-G) mediante análisis

filogenético. Se transmite principalmente durante el invierno en climas templados (Susan y Julián, 2011b).

4.5.3.3 HCoV-NL63. El coronavirus humano NL63, se aisló de una niña de 7 meses con coriza, conjuntivitis, fiebre y bronquiolitis en los Países Bajos en 2004 (van der Hoek *et al.*, 2004). Las infecciones suelen ser mixtas, no suele aumentar la gravedad de la enfermedad. En la mayoría de los pacientes se asocia a síntomas relativamente leves como fiebre, tos, dolor de garganta y rinitis. Además, se considera una de las principales causas de crup en niños. Infecta a personas de todas las edades, y la mayor tasa de infección se produce antes de los 5 años. Se estima que entre el 1 % y el 10 % de la población sufre anualmente síntomas, muestra un pico durante la primavera y el verano en Hong Kong (Milewska *et al.*, 2018; Dewald *et al.*, 2022).

4.5.3.4 HCoV-HKU1. El coronavirus humano HKU, se aisló de un adulto que padecía una enfermedad pulmonar crónica en Hong Kong. Los síntomas clínicos incluían rinorrea, tos, congestión nasal, fiebre, esputo, dolor de garganta, escalofríos, secreción postnasal e hipertrofia amigdalara. Alrededor del 50 % de los pacientes experimentan convulsiones febriles. Además, se lo ha asociado a sibilancias y exacerbaciones del asma (Ou *et al.*, 2017).

Un estudio reciente ha examinado la circulación del HCoV en Israel durante 2015-2016. En la encuesta sobre la gripe de invierno, el 10,36 % de los pacientes estaban infectados con los otros tres HCoV comunes; entre ellos, el 43,43 % estaban infectados con HCoV-OC43, el 44,95 % con HCoV-NL63 y el 11,62 % con HCoV-229E. Aunque está ausente en la encuesta de invierno, el 22,6 % de los pacientes hospitalizados dieron positivo por HCoV-HKU1, principalmente durante el periodo primavera-verano (Berche, 2022).

4.5.4 Patogenia de otros Coronavirus Humanos

HCoV-229E, -OC43, -NL63 y -HKU1 se consideran patógenos causantes de enfermedades de las vías respiratorias superiores y responsables de hasta el 15 %-30 % de los resfriados comunes (Al-Sharif *et al.*, 2021). El HCoV-229E y el HCoV-OC43 se replican principalmente en las células epiteliales de las vías respiratorias superiores, donde producen virus y causan síntomas respiratorios locales (Zeng *et al.*, 2018).

El HCoV-229E aislado en lugares geográficamente distintos muestra poca variabilidad genética, mientras que en el caso del HCoV-OC43 ocurre lo contrario. La capacidad del HCoV-OC43 para tolerar mutaciones probablemente explica su capacidad para crecer en células de ratón e infectar también el cerebro de ratón (Susan y Julián, 2011b). En cuanto al HCoV-NL63,

comparte homología con el HCoV-229E y los análisis filogenéticos sugieren que el HCoV-NL63 y el HCoV-229E divergieron hace aproximadamente 1000 años (Al-Sharif *et al.*, 2021).

4.5.5 Mediadores de respuesta inmune

La expresión de importantes mediadores de la respuesta inmunitaria innata se redujo en las células que expresaban HCoV-OC43 ns12.9, posiblemente debido a la inhibición de la actividad promotora de ISRE, IFN- β y NF- κ B. Sin embargo, para evitar desencadenar una respuesta inmunitaria innata, es más probable que el HCoV-229E entre en las células a través de la vía Tmprss2, ya que la endosoma es un sitio principal para el reconocimiento por los receptores tipo Toll. Del mismo modo, la entrada del SARS-CoV depende de la cisteína proteasa endosomal cathepsina L y de otra serina proteasa similar a la tripsina para activar la proteína S. El HCoV-OC43 emplea una vía de endocitosis dependiente de caveolina-1, y la escisión de las vesículas que contienen virus de la superficie celular es dependiente de dinamina (Shah *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020a).

Las proteínas transmembrana inducibles por interferón (IFITMs) exhiben funciones antivirales de amplio espectro contra varios virus ARN (Channappanavar *et al.*, 2014). Las IFITM restringieron la entrada de HCoV-229E y HCoV-NL63, así como de SARS-CoV y MERS-CoV. Por el contrario, IFITM2 o IFITM3 sirven como factor de entrada para promover la infección de HCoV-OC43. La secuencia central del TRS del HCoV es un hexámero conservado CUAAAC en el HCoV-229E y el HCoV-NL63, y un heptámero conservado UCUAAAC en el HCoV-OC43 y el HCoV-HKU1 (Ding *et al.*, 2021).

4.6 Control y prevención

Las entidades competentes también han proporcionado recomendaciones para la prevención de la infección que incluyen información básica sobre cocinar bien la carne y los huevos (Sharma, 2021). El riesgo de infección puede reducirse con una buena higiene de las manos y un buen protocolo al toser, además del mínimo contacto de personas enfermas con animales sanos. Antes de un brote, los funcionarios de sanidad animal y de salud pública deben considerar desarrollar planes de bioseguridad específicos de los criaderos, zoológicos, animales silvestres, etc (Centers for Disease Control and Prevention, 2019b; Organización Mundial de la Salud, 2020a: WHO, 2021b). Es importante seguir las precauciones recomendadas por las autoridades sanitarias para evitar la propagación del virus. A continuación, se especifican los más importantes:

- Uso de mascarilla
- Permanecer en casa si se muestran síntomas de la enfermedad,
- Desinfectar con frecuencia el hogar y los objetos de uso habitual
- Distanciamiento social
- Higiene de las manos
- Seguridad del trabajador durante actividades de alto riesgo en criaderos infectados o bajo sospecha
- Medidas de cuarentena para criaderos presuntamente infectados y confirmados
- Educar a los operadores del criadero para que informen sobre visones enfermos

4.7 Enfoque General sobre los Murciélagos

En el manual de campo sobre los mamíferos ecuatorianos de Solari (2007a), se destaca a los murciélagos como los únicos mamíferos con capacidad de vuelo, distribuidos en los ecosistemas, tanto en zonas tropicales como en praderas. A nivel mundial, se estima que existen alrededor de 1400 especies de murciélagos, con más de 300 de ellas presentes en Sudamérica, algunas de las cuales se congregan en colonias mientras que otras son solitarias. Desde una perspectiva ambiental, desempeñan un papel crucial como controladores biológicos, contribuyendo significativamente a la polinización, al control de plagas y al proceso de dispersión de semillas, lo que favorece la restauración de áreas boscosas y selváticas.

4.7.1 Taxonomía de los murciélagos

El orden Chiroptera es uno de los órdenes de mamíferos más diverso (Altringham *et al.*, 2005), y se agrupa en 19 familias y 177 géneros (Solari y Martínez, 2017b). La taxonomía de los murciélagos se describe en la Tabla 1 (Hutson y Mickleburgh, 2001).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los murciélagos

Nivel	Descripción
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Orden	Chiroptera
Superorden	Laurasiatheria
Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Infraclase	Eutheria
Clado	Boreoeutheria Epitheria

Nota. Adaptado de Solari, (2007)

En el registro de Díaz y colaboradores (2016a) clasifican a los murciélagos como: Frugívoros que se alimentan de frutos y dispersan semillas de cientos de plantas silvestre. Nectarívoros: se alimentan del néctar y polen de las flores, polinizando cientos de especies de plantas. Insectívoros o artropodófagos: se alimentan de insectos y predominan en cantidad. Hematófagos se alimentan de sangre de otros mamíferos (ganado o de aves).

Quintana y Pacheco (2007) afirman que los murciélagos hematófagos comprenden especialmente 3 especies: *Desmodus rotundus*, *Desmodus youngi* y *Diphylla ecaudata*. El ataque de esta especie presenta un problema económico-sanitaria por transmitir enfermedades como Rabia y Trypanosomiasis. En un estudio llevado a cabo por Frustagli (2020), se señala que los murciélagos actúan como portadores de varios virus zoonóticos, aunque ellos mismos no desarrollan la enfermedad, tienen la capacidad de transmitirla a otros animales e incluso a los seres humanos. Recientemente, se han identificado nuevos virus de la influenza tipo A (Bat-FLUAVs) en murciélagos de especies frugívoras en Guatemala y Perú. Además, se ha confirmado la presencia de coronavirus en dos especies de murciélagos insectívoros, *Tadarida brasiliensis* y *Molossus molossus*, encontrados en las provincias de Santa Fe y Córdoba, respectivamente (Novelli, 2020).

4.7.2 Características Morfológicas

Entre sus características más importantes se encuentran las siguientes, tienen sangre caliente y están cubiertos de pelo, sus crías nacen y son alimentadas por sus madres. Son muy abundantes, pero casi no los percibimos porque son nocturnos y silenciosos, vuelan y se alimentan en plena oscuridad, orientándose mediante el sistema llamado ecolocalización, son sorprendentemente longevos llegando a vivir entre 15-18 o más años (Rivera *et al.*, 2013). Existen de diversos colores blancos, negros, marrones, amarillos y rojizos y sus fuentes de alimentación son variadas. Sin embargo, la mayoría de murciélagos independientemente de su especie pueden ser identificados según las claves taxonómicas (Ossa *et al.*, 2015). Los caracteres utilizados en la clave para la identificación de especies en el campo se describen a continuación:

Cráneo. La forma de la cabeza puede diferir en cada especie. De manera general tienen grandes cuencas oculares y sus hocicos son largos en los nectarívoros y en los vampiros el hocico está reducido (Gaudioso, 2019).

Dientes. Las especies pequeñas, que se alimentan de insectos, pudieran tener hasta 38 dientes, mientras que los vampiros solo cuentan con 20. Los especímenes que comen insectos con caparazón tienen menos cantidad de dientes, pero sus caninos son largos y tienen una mandíbula inferior robusta (Gaudioso, 2019).

Alas. Sus alas pueden medir desde 15 cm (6 pulgadas) hasta 1,5 m (5 pies) de un extremo a otro cuando están bien abiertas. En el proceso de desarrollo embrionario, los dedos de las patas delanteras se extienden, creando unas extremidades especializadas para el vuelo. Con la excepción del pulgar, las falanges de las patas anteriores están alargadas a fin de sostener una fina, amplia y flexible membrana de piel llamada patagio, que le permite sustentarse en el aire (Frick *et al.*, 2020).

Orejas. Las orejas apuntan hacia el frente y generalmente son muy grandes, a menudo están dotadas de surcos o arrugas, poseen un lóbulo de piel que mejora su capacidad de ecolocalización, por la cual se comunican por medio de sonidos de alta frecuencia inaudibles por el hombre y consiguen orientarse y detectar obstáculos para volar en la oscuridad y atrapar su alimento (Neira, 2014).

4.7.3 Hábitat

Mientras los murciélagos no están volando, cuelgan de sus pies, boca abajo, postura conocida como descanso. Algunas especies lo hacen con la cabeza doblada hacia el vientre, otras descansan con el cuello girado hacia su espalda. Algunos son solitarios, mientras otros forman grandes colonias que les permite disminuir el riesgo de depredación (Frick *et al.*, 2020).

Los murciélagos que tienen su hábitat en zonas templadas, emigran cuando comienzan a bajar las temperaturas. Esos sitios de hibernación sirven para que los adultos en capacidad reproductiva se apareen con sus similares de otros grupos (Frick *et al.*, 2020). La mayoría tienen visión mesópica, detectando solamente la luz en bajos niveles, otros la tienen de tipo fotópica, permitiéndoles ver los objetos a color (Rodríguez y Ramírez, 2012).

Aquellas especies de murciélagos que habitan refugios como cuevas, minas, grutas y cavernas, requieren que condiciones micro ambientales particulares (Altringham *et al.*, 2005). Estas cualidades aseguran la supervivencia de las colonias de murciélagos, las cuales pueden ser estables o migratorias. Además, en los refugios de cuevas, los murciélagos se reproducen, crían a sus crías y se protegen de los depredadores y las condiciones climáticas externas (Kunz

et al., 2003). Aquellos que albergan una única especie son denominados refugios monoespecíficos, con dos o más, se les llama refugios multiespecíficos (Díaz *et al.*, 2021b, Rizo *et al.*, 2015).

4.7.4 Reproducción

Se reproducen de modo lento. El período de gestación varía entre 2 y 7 meses, dependiendo de la especie, generalmente dan entre 1 y 3 crías por parto. Los murciélagos insectívoros tienen un período de gestación de 2 a 3 meses, los fitófagos entre 3 y 5 meses, y los hematófagos entre 5 y 7 meses (Díaz *et al.*, 2016a; Rodríguez y Ramírez, 2012).

Al nacer, los pequeños murciélagos tienen dientes. Nacen ciegos y crecen muy rápido desarrollando sus alas y el pelaje. Pasados pocos minutos del nacimiento, la cría busca el pezón de la madre y comienza a lactar, por un lapso aproximado de dos meses, hasta que vuelan por su cuenta y consiguen su alimento. Los murciélagos suelen alcanzar su madurez sexual entre los 12 y 14 meses de vida, variando entre cada especie el modo de apareamiento (Díaz *et al.*, 2021b).

4.7.5 Captura de murciélagos

La captura de murciélagos en refugios o cuevas puede llevarse a cabo durante el día utilizando redes más gruesas, y no es necesario consultar el calendario lunar para realizar esta actividad. Es importante tener en cuenta los riesgos asociados con trabajar en estos lugares, ya que pueden albergar animales peligrosos y microorganismos patógenos para la salud humana (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca “MAGAP” y AGROCALIDAD, 2016).

Es importante predecir la posible vía de entrada tales como son laderas, arroyos, caminos, cañadas, ya que no ingresan por medio de la maleza. La manipulación de los murciélagos para liberarlos de la red se debe realizar cuidadosamente, se sujeta con firmeza del cuerpo, para localizar patas y alas y desenredarlo por completo. Luego se procede a identificar y se lo libera (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca “MAGAP” & AGROCALIDAD, 2016).

4.7.5.1 Redes de niebla: es considerada uno de los métodos más tradicionales y antiguos en la captura de aves y murciélagos, pero su uso es más efectivo en el estudio de las poblaciones de murciélagos. Existen de 2 tipos, las de nylon tranzado o poliéster Dracon y las de nylon

monofilamento. En muchos casos es difícil remover los murciélagos y la red suele romperse (Rodales y Juri 2006). Se recomienda colocarlas en línea recta o L. Se debe evitar dejar la red tensa ya que esto impide una captura adecuada. Los animales colectados son retirados con precaución para evitar herirlos o dañar la red. Sus partes comprenden los soportes (barras de aluminio), bolsillos, tensores y ligas de amarre (Bracamonte, 2018).

4.7.5.2 Equipos de sonido: se suele utilizar los detectores ultrasónicos que permiten detectar y grabar sonidos de ecolocación producidos por los murciélagos que van desde los 20 a 200 kHz (Pech *et al.*, 2010).

Una vez registrados los sonidos de ecolocación emitidos por los murciélagos, se lleva a cabo su análisis en una computadora utilizando software especializado como Batsound, Sonobat, BatScan, Echo Meter Touch y Kailedocospe. Estos programas están diseñados para analizar los sonidos de ecolocación de los murciélagos y admiten formatos de audio de más de 32 bits con uno o dos canales (mono o estéreo), así como frecuencias de muestreo de hasta 192 kHz. Dichos programas muestran las señales de diversas formas, como en oscilogramas y espectrogramas, o en forma de espectro de energía (Lisón y Calvo, 2011; Rizo *et al.*, 2015).

4.7.6 Identificación de especímenes

En el libro de campo “Mamíferos del Ecuador” de Tirira (2007a), y el libro “Clave de Identificación de los Murciélagos Neotropicales” de Díaz *et al.*, (2021b), se explican específicamente las estructuradas a nivel de familias, subfamilias, géneros y especies. En la Figura 1 y 2, se representa las medidas morfológicas y la forma de la hoja nasal respectivamente, que facilitan la clasificación de los murciélagos.

En general, gracias a estudios taxonómicos integrativos o predominantemente moleculares, muchos nombres previamente considerados como subespecies o sinónimos se reconocen ahora como especies válidas, mientras otras, por el contrario, fueron sinonimizadas bajo un nombre existente. Existen páginas web que abarcan la complejidad de cambios en las categorías de géneros y especies como www.batnames.org (Museo Americano de Historia Natural) compilada y editada por Simmons y Cirranello (2020) y la Sociedad Americana de Mamíferos (ASM), citada por Tirira (2021b).

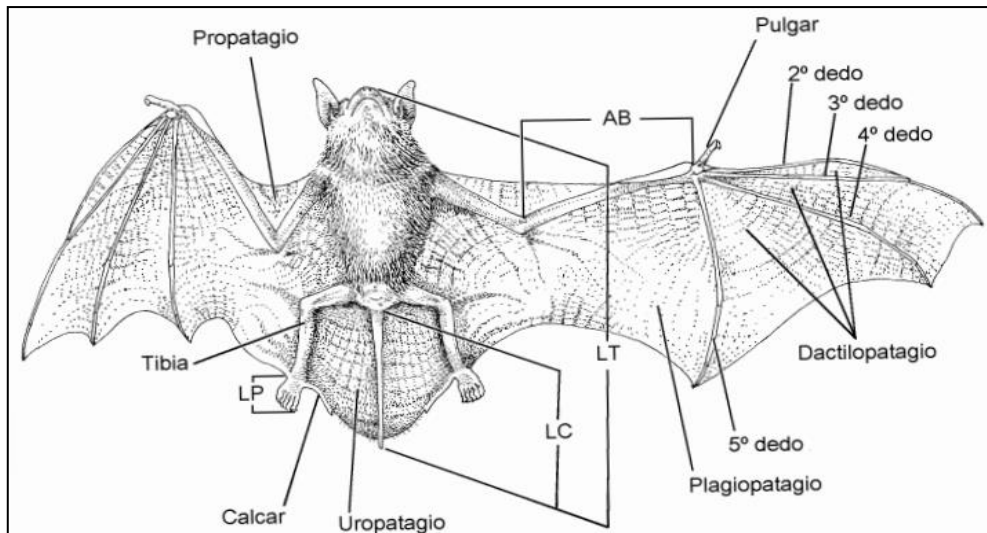


Figura 1. Esquema de medidas en murciélagos
 Nota. Adaptado de (Tirira, 2007a; Díaz et al., 2021b)

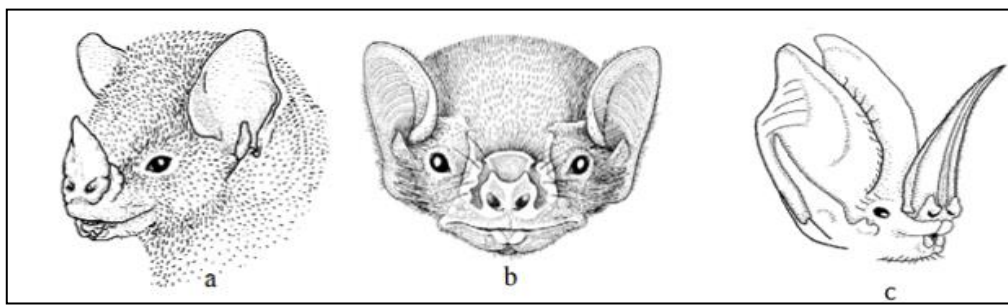


Figura 2. Hoja nasal a) desarrollada, b) rudimentaria y c) alargada
 Nota. Adaptado de (Díaz y Barquez, 2002)

4.7.7 Toma de muestras y transporte de individuos

Para tomar muestras de sangre, hisopados y biopsias, es necesario contar con permiso de colecta otorgado por la Dirección General de Vida Silvestre. La persona que va a realizar estas actividades debe utilizar guantes de látex o nitrilo, cubre bocas y lentes, para evitar estar expuesto a cualquier contacto directo con fluidos del animal (Wilchis, 2004).

El transporte de individuos durante los muestreos, puede ser de forma individual o colectiva. Para el transporte individual se usan bolsas de mantas pequeñas o acorde al tamaño del individuo y para los grupos se utilizan jaulas o mallas mosquiteras con estructura cilíndrica, de esta forma los murciélagos pueden percharse sin el peligro de ser aplastados o asfixiados (Rizo *et al.*, 2015).

4.8 Especies Nativas Del Ecuador

Actualmente se reconocen para el Neotrópico 9 familias, 106 géneros y aproximadamente 450 especies de murciélagos: 22 Emballonuridae, 226 Phyllostomidae, 18 Mormoopidae, 2

Noctilionidae, 2 Furipteridae, 5 Thyropteridae, 11 Natalidae, 56 Molossidae y 108 Vespertilionidae (Díaz *et al.*, 2021).

En cuanto a las especies por país, a pesar de que se debe considerar la precaución con respecto a las posibles diferencias en la taxonomía utilizada por cada autor, los datos son los siguientes, indicando los confirmados (y los probables entre paréntesis): Argentina 67, Bolivia 146 (1), Brasil 181 (4), Colombia 217 (4), Chile 14, Ecuador 183 (3), Guyana 125 (6), Guayana Francesa 101 (2), Paraguay 57 (2), Perú 188 (2), Surinam 99 (8), Uruguay 22 (3) y Venezuela 172 (2). En Sudamérica, Colombia es el país con mayor diversidad de murciélagos, seguido por Perú, Ecuador y Brasil (Males, 2019). Es notable que, a pesar de su pequeña superficie, Ecuador posee un número mayor de especies registradas (Solari, 2007a).

La cordillera de los Andes es uno de los procesos históricos más importantes que intervino dentro de la diversificación de murciélagos, abarca 1,5 millones de km² con un rango altitudinal que va desde 600 hasta 6000 m y se distribuyen en la porción occidental de Sudamérica (Martínez *et al.*, 2012).

4.8.1 Distribución de Murciélagos en Ecuador

La variedad de murciélagos en Ecuador se divide en las ocho familias tradicionalmente reconocidas, que abarcan 62 géneros, 168 especies y 73 subespecies (véase tabla 2). La familia Phyllostomidae destaca como la más variada en el país, con 109 especies distribuidas en seis subfamilias y 36 géneros. Este nivel de diversidad representa aproximadamente el 65 % de todas las especies de murciélagos registradas hasta la fecha en Ecuador (Tirira, 2012c; Tirira, 2021b).

En la familia Phyllostomidae, la subfamilia Stenodermatinae exhibe la mayor variedad, con 53 especies, lo que representa el 49 % del total de filostómidos y el 32 % de todas las especies de murciélagos del país (Barquez *et al.*, 2020). Otras familias que muestran una diversidad notable son Molossidae y Vespertilionidae, con 19 y 18 especies respectivamente, cada una representando aproximadamente el 11 % del total nacional para su familia. Molossidae cuenta con una subfamilia y ocho géneros, mientras que Vespertilionidae tiene dos subfamilias y cinco géneros. Entre los géneros más diversos se encuentran siete pertenecientes a la familia Phyllostomidae (Arias *et al.*, 2016).

El orden Chiroptera no ha destacado por su riqueza en especies endémicas en Ecuador. De las 38 especies de mamíferos endémicos mencionadas por Tirira (2007a), solo cinco pertenecían a los murciélagos: *Anoura fistulata*, *Lonchophylla orcesi*, *Lophostoma aequatorialis*, *L. yasuni* y *Molossops aequatorianus*. Sin embargo, en la actualidad, solo tres de estas especies se consideran endémicas, ya que una especie ha sido registrada en uno de los países vecinos (*A. fistulata*) y otra ha experimentado cambios taxonómicos (*L. aequatorialis*). (Díaz *et al.*, 2021b).

De acuerdo con Yáñez (2016) el 19 % del territorio ecuatoriano se encuentra dentro del Patrimonio de Áreas Naturales del Estado (PANE), que al momento está constituido por 45 áreas protegidas que están integradas dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador (tabla 3), que incluye reservas de la biósfera, biorreservas y bosques protectores (Ministerio del Ambiente, 2015). El área de protección que cubre el PANE en el Ecuador continental es del 17% del territorio total (41,027 km², de una superficie total de 248,197 km²) (Burneo y Tirira, 2014).

Tabla 2. Diversidad de murciélagos en el Ecuador (géneros, especies y subespecie)

Familia / Subfamilia	Géneros	Especies	Subespecies
Emballonuridae	7	12	5
Declidurinae	1	2	1
Emballonurinae	6	10	4
Phyllostomidae	36	109	39
Desmodontinae	3	3	3
Glossophaginae	4	11	5
Lonchophyllinae	2	12	-
Phyllostominae	14	23	13
Carolliinae	2	7	2
Stenodermatinae	11	53	16
Mormoopidae	2	2	2
Noctilionidae	1	2	3
Furipteridae	2	2	-
Thyropteridae	1	4	2
Molossidae	8	19	12
Molossinae	8	19	12
Vespertilionidae	5	18	10
Vespertilioninae	4	11	6
Myotinae	1	7	4
Total	62	168	73

Nota. Adaptado de Tirira y Burneo, (2014)

Tabla 3. Registro de murciélagos según las provincias del Ecuador

Provincia	Región	No. Especies	No. Localidades	No. Registros
Carchi	Sierra	1	1	5
Cotopaxi	Sierra	1	1	1
El Oro	Costa	3	6	51
Esmeraldas	Costa	6	17	60
Guayas	Costa	3	10	29
Imbabura	Sierra	3	32	11
Loja	Sierra	8	10	5
Los Ríos	Costa	3	9	19
Manabí	Costa	3	8	9
Morona Santiago	Amazonía	4	5	9
Napo	Amazonía	5	11	16
Orellana	Amazonía	8	38	145
Pastaza	Amazonía	6	21	109
Santo Domingo	Costa	4	4	6
Sucumbios	Amazonía	7	27	89
Zamora Chinchipe	Amazonía	4	4	6
Sin datos	No determinada	7	-	11
Total		20	175	581

Nota. Adaptado de Tirira y Burneo, (2012)

4.9 Definición de Secuenciación

Un genoma es como un libro que está comprendido con 30 mil letras, y esas letras están distribuidas por varias partes. La secuenciación a breves rasgos es tratar de identificar cuáles son las letras que comprenden esas páginas que forman ese libro. Cuando se analizan las muestras de hisopados se extrae el ARN que es el material genético del virus, y a partir de ahí se puede comprender su linaje compuesto de un árbol genealógico. Actualmente la plataforma Nextstrain identifica veintidós clados filogenéticamente relacionados a las variantes del SARS-CoV-2. Estos clados se nombran según los dos últimos dígitos del año estimado en que surgieron, seguidos de una letra genérica (A, B, C) (Nextstrain, 2021).

Con el diagnóstico se analiza la presencia o ausencia de la particularidad. Se trata de identificar la lectura completa de esos libros, así se puede descubrir nuevas variantes que pueden ser de interés, de preocupación, de monitoreo, etc. A su vez el resultado es publicado en la plataforma GISAID. Por otro lado, se clasifican las secuencias del SARS-CoV-2 en ocho clados: S, L, O, V, G, GH, GR y GV. Se ha observado que las últimas cuatro categorías contienen la mutación D614G en la glicoproteína spike del virus, la cual está presente en las variantes de mayor preocupación (Tegally, 2021; Jacob *et al.*, 2021; GISAID, 2020).

5. Metodología

5.1 Área de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en las provincias de Loja (cantón Loja, Catamayo, Saraguro), y en Zamora Chinchipe (cantón Zamora, Yantzaza y Yacuambi) (Figura 3). La zona geográfica se sitúa al sur del país, en la región sierra y amazónica. Se caracteriza por sus climas multivariados, desde los 0 hasta 2400 msnm, considerando su productividad hacen que esta zonal sea propicia para la explotación agropecuaria.

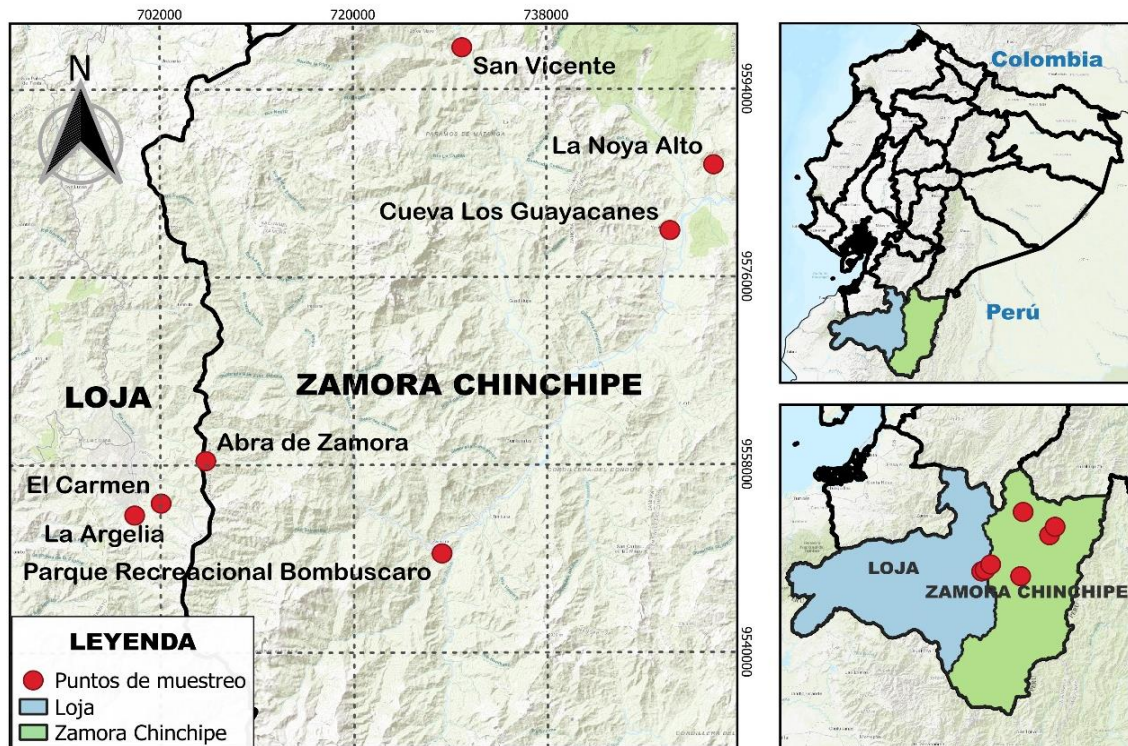


Figura 3. Georreferencia del área de estudio y puntos de muestreo
Nota. Adaptado de QGIS versión 4.4 (2022)

5.2 Diseño de estudio

Es de carácter observacional con enfoque de corte transversal.

5.3 Tipo de muestreo y tamaño de muestra

Se realizó un muestreo no probabilístico (por conveniencia), donde se tomó como tamaño muestral 126 animales en total.

Las muestras fueron etiquetadas en base al proyecto desarrollado por el grupo de investigación genética y biología molecular y nombradas por sus siglas en inglés GMB (*Genetic and Molecular Biology*).

5.4 Métodos y técnicas

5.4.1 Captura e identificación de individuos

Se procede a ingresar al lugar con luces encendidas tanto en casa abandonadas como en cavernas, luego se alistan los materiales para armar y colocar las redes de niebla en forma lineal o “L” para abarcar la mayor zona posible.

Una vez que los murciélagos se quedan atrapados en la red (Anexo 3), se procede a desenredarlos uno por uno, tomándolos cuidadosamente de la cabeza y sus alas, para luego colocarlos en bolsas de tela térmicas por un periodo de 10 min como máximo, para su posterior identificación.

Para la identificación correcta de los especímenes se siguió la terminología propuesta por Tirira (2007a) y Díaz *et al.*, (2021b) en sus libros “Mamíferos del Ecuador” y “Clave de Identificación de los Murciélagos Neotropicales”, respectivamente. Como datos importantes se consideraron las coordenadas geográficas, fecha de recolección de cada individuo, información ecológica, sexo, madurez sexual, número total de animales capturados, grupo de clasificación/especie, presencia o ausencia de alas pterigoideas, presencia o ausencia de uropatagio (Anexo 1).

Para identificar la madurez sexual en los especímenes machos, se determinó el tamaño, forma y posición de los testículos (escrotales, inguinales o impalpables), para el caso de las hembras se evaluó la presencia o ausencia de pezones (no evidente, lactante o post lactante). Para los análisis solo se utilizaron especímenes que tengan más de 2 individuos en la misma especie para mantener una muestra homogénea y evitar errores estadísticos. Todos los animales fueron liberados sin ningún daño aparente y se manejaron con sumo cuidado de conformidad con los principios de bienestar animal. Más adelante, en la sección de consideraciones éticas se especifican las normativas de bioéticas para el uso de animales en investigación y manejo de animales silvestres.

5.4.2 Toma y transporte de muestras

Se tomaron muestras de tipo orofaríngeas por cada animal, mediante un hisopo, girando la cabeza de algodón por varias ocasiones dentro del hocico. Las muestras se colocaron en tubos de centrífuga que contenían 2,5 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), cortando la parte sobresaliente del hisopo para cerrar el criovial y se conservaron en refrigeración a una

temperatura de -4 °C dentro de un cooler hasta llegar al laboratorio del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, donde se llevó a cabo el análisis de RT-qPCR.

Todos los tubos fueron debidamente rotulados con el código asignado en campo para cada especie (Anexo 2). Sólo con las muestras positivas conservadas en cadena de frío, se realizó la secuenciación en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Guayaquil. Las muestras positivas fueron evaluadas nuevamente para evitar contaminación cruzada.

5.5 Extracción de ARN y Secuenciación

El ARN viral se aisló utilizando el protocolo del kit comercial (MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation) de Applied Biosystems, modificado para un volumen total de muestra de 200 µl, con el siguiente volumen por reacción para cada muestra: Mix de Vinculación Solución-Perlas magnéticas (265 µl + 10 µl) y, Proteinasa K (5 µl). La extracción se realizó de forma automática en el AutoPure Pro32 de Gentech Biosciences, para cada extracción a lo largo de la placa se utilizó Master Mix de extracción + muestra (280 µl), Tampón de lavado (500 µl), etanol 80 % (500 µl), etanol 80 % (250 µl), tampón de elución (70 µl).

La determinación de presencia/ausencia de SARS-CoV-2 se obtuvo con el kit comercial (TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR) a través de una RT-qPCR. La reacción de qPCR utilizó los siguientes volúmenes para una reacción total de 20 µl: TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix 4X (6,25 µl), COVID-19 Real Time PCR Assay Multiplex (1,25 µl), Agua libre de nucleasas (7,50 µl), ARN extraído (10 µl). El ensayo se realizó en el equipo QuantStudio5 de Applied Biosystems con una placa de reacción de volumen 0,1 µl con el programa detallado a continuación:

Tabla 4. Protocolo de qPCR para diagnóstico de Coronavirus

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Incubación de UNG	25	2 minutos	1
Transcripción inversa	53	10 minutos	1
Activación	95	2 minutos	1
Desnaturalización	95	3 segundos	40
Hibridación/extensión	60	30 segundos	

A partir de las muestras positivas de murciélagos de la especie *Anoura geoffroyi* y *Desmodus rotundus*, se llevó a cabo el proceso de extracción de ácido nucleico utilizando el kit (Qiagen Viral RNA mini) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El proceso de RT-

qPCR se llevó a cabo con el uso de cebadores y sondas de protocolo del Hospital Charité de Berlín, Alemania (Corman *et al.*, 2020). Este protocolo se basa en la detección de la región E, para detectar el betacoronavirus asociado a murciélagos para el SARS-CoV-2, seleccionando las muestras con valores de CT más bajos. Es relevante destacar que el proceso de secuenciación de nueva generación se realizó utilizando la tecnología ILLUMINA con el kit (CovidSeq) y el equipo MiSeq con las recomendaciones del fabricante, el procedimiento incluye las siguientes fases: Desnaturalización del ADN, Síntesis de la primera cadena de ADNc, Síntesis de la segunda cadena de ADNc, Etiquetado, Limpieza de la librería, Normalización de la librería, Hibridación, Enriquecimiento de la librería, Amplificación y Limpieza de la librería enriquecida. A continuación, se llevó a cabo el proceso de cuantificación de la biblioteca utilizando el kit (QuantiFluor ONE dsDNA System) para normalizar las bibliotecas genéticas.

5.6 Análisis de datos e interpretación

Los datos se presentaron mediante una tabla de frecuencias para establecer la infección por SARS-CoV-2 y otros coronavirus humanos. Se aplicó el test Exacto de Fisher o Chi-cuadrado para determinar la relación entre la variable dependiente y las independientes tanto dicotómicas como politómicas, mientras que, el test Binomial se aplicó específicamente para la variable “sexo”. Se consideró un *P* valor menor a 0,05 como estadísticamente significativo en los dos test, todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Jamovi versión 2.4.11 de libre acceso.

El análisis bioinformático de la secuenciación se manejó en el programa DRAGEN COVID con la herramienta COVID LINEAGE en BASE SPACE SEQUENCE HUB, así mismo, se hizo uso de las herramientas NEXTCLADE y PANGOLÍN para corroborar los resultados obtenidos (Laboratory Diagnosis of nCoV 1, 2023). Además, se empleó el Software MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) para determinar la similitud de las secuencias y finalmente, para elaborar el alineamiento múltiple de las secuencias se usó la herramienta Crustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), conjuntamente con la base de datos GISAID (<https://gisaid.org/wiv04/>).

5.7 Consideraciones éticas

Los animales fueron manejados de conformidad con las regulaciones para el cuidado y uso de animales en investigación en el “Código Orgánico del Ambiente” (ROS No 983, Ecuador).

Los lineamientos de Regulación y Control Zoonosario para el “Programa de Prevención y Control de Rabia Bovina” se basaron en la normativa vigente de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario (AGROCALIDAD) donde los operativos de control de vectores se basan en el Manual para la Prevención y Control de Rabia Bovina en el Ecuador, codificada en la Ley Orgánica de la Sanidad Agropecuaria, mediante Resolución DAJ-2013461-0201.0214, la cual fue publicada en el Registro Oficial N°211 el 25 de marzo de 2014, ningún animal fue sacrificado.

Para la captura y toma de muestras también se aplicó la normativa vigente de la Universidad Técnica Particular de Loja basadas en el Estudio y Manejo de mamíferos silvestres del Ecuador descrita en la Asociación Ecuatoriana de Mastozoología (AEM) y aprobada por la Sociedad Americana de Mastozoología publicada en el (2016) y actualizada al año 2022 que cuenta con herramientas oficiales en Ecuador y Latinoamérica.

6. Resultados

6.1. Frecuencia de infección relacionado al SARS-CoV-2 en murciélagos de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe.

Se analizaron 126 murciélagos de los cuales el 19,84 % corresponden a la provincia de Loja y el 80,16 % a la provincia de Zamora Chinchipe (Figura 4). Con el uso de la técnica RT-qPCR se logró detectar un 13,49 % de muestras positivas al SARS-CoV-2 entre las dos provincias de estudio, sin embargo, al comparar entre ellas no hubo diferencia estadística en el porcentaje de positivos (Tabla 5).

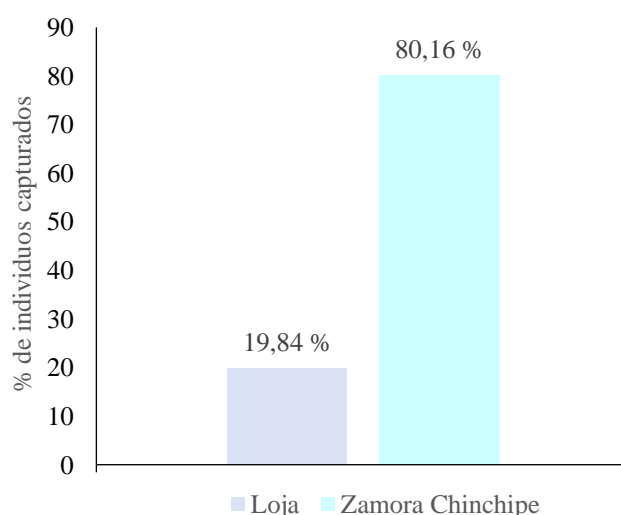


Figura 4. Individuos capturados entre la provincia de Loja y Zamora Chinchipe

Tabla 5. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos de Loja y Zamora Chinchipe.

Provincia	Negativos	%	Positivos	%	Total	<i>p</i> -valor
Loja	22	88	3	12	25	0,807
Zamora Chinchipe	87	86,14	14	13,86	101	
Total	109		17		126	

Nota. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para verificar diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones, se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo*

6.2. Frecuencia de infección al SARS-CoV-2 según su localidad.

El mayor porcentaje de negativos se presentó en la Argelia 91,30 %; seguido de la Cueva de los Guayacanes 89,36 % y el Parque Bombuscaro 87,50 %; mientras que la localidad donde se observa un mayor porcentaje de positivos es en el Carmen con un 50 % de los casos, seguido de San Vicente con un 20,00 % y la Noya Alto con un 17,65 % (Tabla 6); sin embargo, las

diferencias observadas en las proporciones de cada localidad no son estadísticamente significativas.

Tabla 6. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos según su localidad.

Localidad	Total	Negativo		Positivo		p-valor
		N	%	N	%	
Abra de Zamora	2	2	100	0	0	0,643
Cueva de los Guayacanes	47	42	89,36	5	10,64	
El Carmen	2	1	50,00	1	50,00	
La Argelia	23	21	91,30	2	8,70	
La Noya Alto	34	28	82,35	6	17,65	
San Vicente	10	8	80,00	2	20,00	
Parque Bombuscaro	8	7	87,50	1	12,50	
Total	126	109	86,51	17	13,49	

Nota. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado, valor estadísticamente significativo (< 0.05)*

6.3. Frecuencia de SARS-CoV-2 en murciélagos con relación a la especie.

Del total de murciélagos 17 estuvieron relacionados con el SARS-CoV-2 y pertenecen a la familia Phyllostomidae, se identificaron 9 especies y géneros descritas en la Tabla 7. De todos los positivos, el 35,29 % (6 casos) corresponden a *Carollia perspicillata*, seguida de *Desmodus rotundus* con un 23,53 % (4 casos), y *Carollia sp* junto con *Anoura geoffroyi* representan el 17,65 % (3 casos) cada una respectivamente. Adicionalmente, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 7. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos con respecto a la especie.

Especie	Total	Negativo		Positivo		p-valor
		N	%	N	%	
<i>Anoura geoffroyi</i>	26	23	21,10	3	17,65	0,426
<i>Carollia brevicaudum</i>	1	1	0,92	0	0	
<i>Carollia perspicillata</i>	35	29	26,61	6	35,29	
<i>Carollia sp</i>	15	12	11,01	3	17,65	
<i>Dermanura glauca</i>	1	1		0	0	
<i>Desmodus rotundus</i>	37	33	0,92	4	23,53	
<i>Enchisthenes hartii</i>	1	0	30,28	1	5,88	
<i>Histiotus montanus</i>	1	1	0,92	0	0	
<i>Sturnia giannae</i>	9	9	8,26	0	0	
Total	126	109	13,49	17	86,51	

Nota. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado, valor estadísticamente significativo (< 0.05)*

6.4. Frecuencia de SARS-CoV-2 en murciélagos de acuerdo al sexo.

Se determinó que 37 individuos son hembras, 60 son machos y en los 29 restantes no se estableció el sexo, puesto que, se cambió el protocolo de captura. Dentro de los 17 individuos

positivos, los machos representan un 52,94 % en comparación con las hembras 47,06 %, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de infección al SARS-CoV-2 en murciélagos según el sexo.

Resultado	Sexo	N	Total (%)	p-valor
Positivo	Hembra	8	47,06	0,088
	Macho	9	52,94	
Total		17	100	

Nota. Se utilizó un test Binomial, valor estadísticamente significativo (< 0.05)*

6.5. Frecuencia de otros Coronavirus (CoV) en murciélagos.

Se analizaron 31 muestras respecto a la infección por otros CoV, logrando obtener un 24,60 % de individuos positivos. El mayor porcentaje se encontró en el Coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63) con 12 casos que representan el 38,70 %, seguido del Coronavirus Humano KU1 (HCoV-HKU1) con 9 casos correspondientes al 29,03 %, prosigue el Coronavirus Humano 229E (HCoV-229E) que posee un 19,35 % (6 casos) y finalmente el Coronavirus Humano OC43 (HCoV-OC43) que presenta un 12,90 % (4 casos) (Tabla 9). Los datos no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 9. Presencia de otros CoV

Coronavirus	Positivos		p-valor
	N	%	
HKU1	9	29,03	0,123
NL63	12	38,70	
OC43	4	12,90	
229E	6	19,35	
Total	31	24,60	

Nota. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado, valor estadísticamente significativo (< 0.05)*

6.6. Análisis Filogenético

Para estimar las similitudes de identidad de los genomas frente a la infección por SARS-COV-2, se realizó un análisis filogenético utilizando las secuencias de murciélagos codificadas como GMB7 (*Anoura geoffroyi*), GMB58 (*Desmodus rotundus*), GMB60 (*Desmodus rotundus*), GMB68 (*Desmodus rotundus*), y GMB72 (*Desmodus rotundus*), mismas que fueron puestas en contraste con la secuencia genómica del SARS-CoV-2 (NCBI Reference Sequence: NC_045512.2).

Se realizó una matriz de identidad porcentual con la herramienta “Clustal Omega”, la cual hizo la alineación múltiple entre las secuencias existentes frente al genoma de referencia del SARS-CoV2 (NCBI Reference Sequence: NC_045512.2). Se comprobó que la especie *Anoura geoffroyi* (GMB7) tiene una similitud más cercana con un 75,89 %, seguida de la especie *Desmodus rotundus* (GMB72) que posee un 69,15 % (Tabla 10).

Tabla 10. Matriz de identidad porcentual entre secuencias analizadas y el genoma de referencia.

N	Código	Resultado					
1	NC_045512.2	100.00	69.15	75.89	67.05	56.30	57.13
2	GMB72	69.15	100.00	59.54	61.67	47.39	44.29
3	GMB7	75.89	59.54	100.00	75.01	67.44	61.25
4	GMB68	67.05	61.67	75.01	100.00	57.43	54.84
5	GMB58	56.30	47.39	67.44	57.43	100.00	66.30
6	GMB60	57.13	44.29	61.25	54.84	66.30	100.00

Posteriormente se elaboró un árbol filogenético por el método de distancias (*Neighbor-Joining*) entre las secuencias relacionadas al SARS-CoV-2 (Figura 5). Al observar estos resultados, se pudo inferir que las distancias más cercanas GMB7 (0.02374) entre las especies o secuencias representadas indican relaciones más cercanas, mientras que las distancias más alejadas GMB 58 y GMB 60 (0.21343 y 0.21291) sugieren mayores diferencias evolutivas. En general, cuanto mayor sea la distancia, mayor será la divergencia evolutiva.

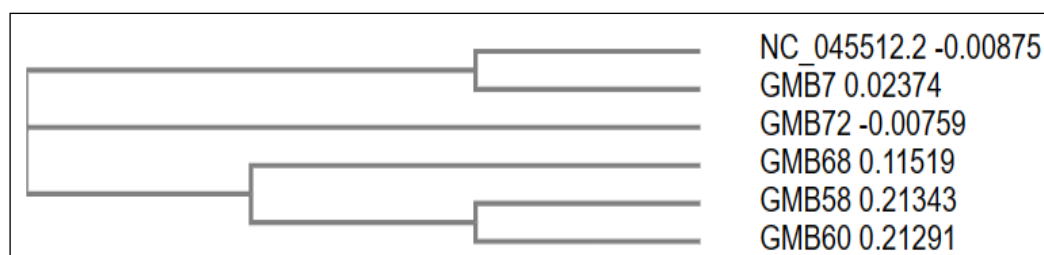


Figura 5. Árbol filogenético por el método Neighbor-Joining

7. Discusión

En la investigación realizada se analizó 126 muestras orofaríngeas, resultando un 13,49 % de la población estudiada positiva a SARS-CoV-2 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. Según la actual información es el primer trabajo relacionado con los reservorios naturales en murciélagos entre las provincias antes mencionadas. En Ecuador el primer informe epidemiológico sobre la presencia de SARS-CoV-2 fue el 29 de febrero del 2020 (OMS, 2020a). Así mismo, Eloit *et al.*, (2020) analizaron 645 murciélagos, mismos que albergaban dos docenas de tipos de coronavirus, y el 0,47 % resultaron positivos a SARS-COV-2 en la península de Indochina. En otro estudio, se analizó muestras orofaríngeas y rectales de 985 murciélagos, resultando el 6,5 % de la población estudiada positivo a diversos coronavirus (Tang *et al.*, 2006).

El Diario (2022) comunicó, que el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (*INSPI*) a inicios del 2021 analizó varias muestras de animales de compañía, roedores y fauna silvestre en la ciudad de Guayaquil e informó la detección del virus por medio de RT-qPCR, correspondiendo un 49 % a fauna urbana; 11 % en animales silvestres; 28 % concierne a los animales de compañía y 12 % a otras categorías. Por otro lado, se produjeron un total de 13,529 alertas relacionadas con animales infectados, en donde la ciudad con mayor número de alerta fue Quito con 43 % y Guayaquil con 10 %. Estos resultados fueron similares a los encontrados en nuestro estudio, por la técnica RT-qPCR, en los cuales la mayor frecuencia de infección se registró en la provincia de Zamora Chinchipe 80,16 %; seguido de la provincia de Loja 19,84 %. Novelli (2020), demostró la circulación de coronavirus en dos especies de murciélagos insectívoros *Tadarida brasiliensis* y *Molossus molossus* provenientes de las provincias de Santa Fe (n=58) y Córdoba (n=49) respectivamente.

De la misma manera, Dileepan *et al.*, (2021) reportan que los niveles de seropositividad varían según la población animal estudiada y comprende desde 0,7 a 35 % en regiones de Alemania, Italia, Polonia, Croacia, España, Francia, EE. UU y Brasil. Sus resultados demuestran que las tasas de seropositivos al SARS-CoV-2 son más altas en gatos siendo el 8 % que en perros de compañía con el 1 %, realizadas mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). En contraste con nuestro estudio, la localidad donde se observa un mayor porcentaje de positivos es en el Carmen con un 50 % de los casos, seguido de San Vicente con un 20 % y la Cueva de los Guayacanes con un 10,64 %.

Bonilla *et al.*, (2021) reportaron la presencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en murciélagos de la selva amazónica. De igual forma Katherine *et al.*, (2021) señalan que si bien es posible que los murciélagos y los humanos se hayan infectado con el SARS-CoV-2 de forma independiente, el descubrimiento de partículas virales de SARS-CoV-2 en murciélagos en Ecuador es un recordatorio de que los murciélagos son una fuente potencial de virus emergentes.

La reciente pandemia nos recuerda la diversidad que tienen los virus ARN, puesto que pueden propagarse y adaptarse a cualquier huésped, especialmente murciélagos. Como los coronavirus afectan a tantas especies, y los murciélagos son hospedadores naturales de innumerables virus, se debe estudiar las transmisiones inter-especie, puesto que esta familia forma un complejo ecosistema, del que se sabe poco.

Se analizaron 126 hisopos orofaríngeos de 7 localidades y 9 especies distintas de murciélagos, se logró identificar 9 especies, sin embargo 4 resultaron estar relacionadas al SARS-CoV-2 como son *Carollia perspicillata* 35,29 %, seguido de *Desmodus rotundus* 23,53 %, y finalmente, *Carollia sp* junto con *Anoura geoffroyi* representan el 17,65 % respectivamente. Un estudio similar realizado por Luan *et al.*, (2020b) identificó 5 especies con alta susceptibilidad cuya ACE2 podría unirse a la proteína S del SARS-CoV-2 entre ellos: *Rhinolophus macrotis*, *Rhinolophus sinicus*, *Rhinolophus pearsonii*, *Rousettus leschenaultii* y *Pteropus vampyrus*. Schlottau *et al.*, (2020) reportaron una susceptibilidad del 78 % en murciélagos frugívoros (*Rousettus aegyptiacus*) a la infección por SARS-CoV-2 en condiciones experimentales (inoculados vía intranasal).

En México, de 606 murciélagos muestreados de 42 especies diferentes, 32 muestras fueron positivas a 13 coronavirus (CoV) distintos; 9 eran CoV alfa, 4 CoV beta y 12 eran nuevos. En un murciélago *Nyctinomops laticaudatus* se encontró un β -CoV con un 96,5 % de identidad aminoacídica con el β -CoV asociado a la enfermedad humana en Oriente Medio (Anthony *et al.*, 2013a). En España se han detectado 14 coronavirus en 9 especies ibéricas de murciélagos, evidenciando una diversidad y distribución amplia de alpha y coronavirus en España (Falcón *et al.*, 2011). La vigilancia de posibles brotes de coronavirus implica el estudio de los murciélagos en cada nación, para así establecer la ecología de la extensa familia, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

En el laboratorio Friedrich-Loeffler (FLI) (2020), se determinaron que los animales inoculados por vía nasal con SARS-CoV-2 no muestran ningún síntoma de enfermedad ni infección eficaz a sus congéneres. Aunque, los resultados muestran que los murciélagos son susceptibles a la infección por SARS-COV-2. La Universidad de Anglia Oriental (UEA), la Sociedad Zoológica de Londres (ZSL) y Salud Pública de Inglaterra (PHE), (2021) analizaron 53 murciélagos de herradura menor perteneciente a la especie *Rhinolophus affinis*, dando como resultado un positivo (1,9 %) denominado 'RhGB01' (Crook *et al.*, 2021). Los científicos Juste, Figueras y Echevarria, (2020) reportaron que el 2,7 % de virus encontrados en murciélagos frente a los roedores que presentan en promedio 2,48 % indica que los murciélagos no son más peligrosos en relación con posibles zoonosis que el resto de los mamíferos.

Lau *et al.*, (2005) identificaron un CoV estrechamente relacionado con el SARS-CoV (bat-SARSCoV) en 23 (39 %) de 59 frotis anales de murciélagos de herradura chinos salvajes (*Rhinolophus sinicus*) mediante RT-PCR. En el 84 % de los murciélagos de herradura chinos se detectaron anticuerpos contra la proteína nucleocápside recombinante del SRAS-CoV de murciélago mediante un inmunoensayo enzimático. En la mayoría de estudios no se especifica si el SARS-CoV-2 afecta más a los machos que a las hembras o viceversa, como resultado ambos sexos contenían material genético estrechamente relacionado con el SARS-CoV.

Pérez *et al.*, (2020) realizaron un estudio sobre el salto inter-especie, en donde la transmisión de la enfermedad proveniente del murciélago a través del hospedador intermedio como camello, civeta y pangolín causa una enfermedad respiratoria grave. Aunque los resultados de este estudio apuntan al potencial de los murciélagos frugívoros como modelo de hospedador reservorio, el riesgo de infección por SARS-CoV-2 en murciélagos de vida libre tendrá un gran impacto en los programas de protección ecológica de los murciélagos.

Por otra parte, la frecuencia de infección por otros coronavirus, considerando la población total de murciélagos es de 24,6 %. El 9,52 % de HCoV-NL63 fue mayor en comparación con el 7,14 % de HCoV-HKU1; seguido del 4,76 % de HCoV-229E y finalmente el 3,17 % de HCoV-OC43. De igual forma Ge *et al.*, (2016) identificaron 6 especies de murciélagos: *Rhinolophus sinicus*, *Rhinolophus affinis*, *Hipposideros pomona*, *Miniopterus schreibersii*, *Miniopterus fuliginosus* y *Miniopterus fuscus*, que representan entre el 80 % y 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con especies *Alphacoronavirus* entre ellas BtCoV HKU2, BtCoV HKU8 y BtCoV1, y especies no asignadas BtCoV HKU7 y BtCoV HKU10. De

igual modo, Woo et al, (2006b) analizaron hisopados anales de 309 murciélagos de 13 especies en 20 lugares distintos, siendo de 37 (12 %) positivos seis nuevos coronavirus; cuatro eran del grupo 1 (bat-CoV HKU2 del murciélago chino de herradura, bat-CoV HKU6 del murciélago de patas grandes de Rickett, bat-CoV HKU7 del murciélago de alas curvas y bat-CoV HKU8 del murciélago de alas curvas) y dos del grupo 2 (bat-CoV HKU4 del murciélago de bambú menor y bat-CoV HKU5 del pipistrello japonés). Zhou *et al.*, (2020a) afirman que la especie *Rhinolophus affinis* (BatCoV RaTG13) mostraba una elevada identidad de secuencia 96,1 % con el 2019-nCoV. Así mismo, la cepa RaTG13 (CoV4991), mostró una identidad en la secuencia de nucleótidos del 93,1 % con Bat-CoV-RaTG13, siendo la de mayor identidad en comparación con otros coronavirus descritos.

La aparición de varias enfermedades infecciosas emergentes en humanos está relacionada con una amplia gama de virus encontrados en murciélagos portadores. La investigación para comprender mejor esta relación entre el SARS-CoV-2, el papel de los murciélagos y los humanos no es del todo clara en la transmisión de la enfermedad, por lo que esta relación no está claramente establecida. Si bien es cierto, existe la posibilidad de que los murciélagos sean una fuente de la enfermedad en Ecuador, es importante acotar que existen otras vías de transmisión/exposición de la enfermedad. Sólo el 6 % de todas las secuencias de CoV del GenBank proceden de murciélagos (Anthony *et al.*, 2017b).

Con respecto al análisis genómico, es más práctico investigar la historia evolutiva de los virus ARN mediante un único gen funcional en lugar de examinar genomas virales completos. Los árboles filogenéticos se construyen utilizando este gen relativamente conservado, lo que sugiere la posibilidad de una co-divergencia entre virus y hospedador a lo largo de extensos periodos evolutivos, aunque no siempre se pueda establecer una relación de macroevolución estricta entre ambos. En el caso de los coronavirus transmitidos por murciélagos, parece que todos derivan de un virus ancestral con la capacidad de transmitirse entre especies. Finalmente, esta investigación caracterizó un coronavirus de referencia con las secuencias obtenidas de murciélagos de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe y resalta la importancia de realizar estudios de vigilancia para prepararnos ante una futura aparición de reservorios de fauna silvestre.

Las secuencias analizadas se sitúan en 2 clados diferentes a nivel mundial, el clado 20B (linaje B.1.1.161 y linaje B.1.1.) y 22F (linaje XBB) que corresponde a los linajes Saudí,

europeo y Recombinante, respectivamente. A su vez pertenecen a las variantes Lambda y Ómicron. La OMS (2023b), informó que el clado 20B se encontraba en circulación a nivel mundial desde el 3 de febrero del 2020 y el clado 22F estuvo en circulación desde el 10 de enero del 2022. Lo que confirma la presencia de los linajes en nuestro país, puesto que las muestras fueron recolectadas con fecha 18, 22 y 25 de agosto del año 2022 y pertenecen a la especie *Desmodus rotundus* y *Anoura geoffroyi*.

Se comprobó que la especie *Anoura geoffroyi* (GMB7) tiene una similitud más cercana con un 75,89 %, seguida de la especie *Desmodus rotundus* (GMB72) que posee un 69,15 %. Además, las distancias resultantes en el árbol filogenético construido mediante el método de distancias *Neighbor-Joining* indican la medida de diferencia o divergencia evolutiva entre las secuencias comparadas. La distancia GMB7 (0.02374) sugiere una similitud cercana entre las secuencias comparadas, lo que indica que las secuencias comparten un ancestro común más reciente y han experimentado pocos cambios a lo largo del tiempo. Mientras que, las distancias GMB 68 (0.11519), GMB58 (0.21343), y GMB (0.21291) implica una mayor diferencia o divergencia evolutiva en comparación con la distancia anterior. Las secuencias están menos cercanas evolutivamente y han experimentado más cambios a lo largo del tiempo.

8. Conclusiones

Se detectaron animales positivos mediante la técnica RT-qPCR, al evaluar las 126 muestras, se obtuvo un mayor porcentaje de casos positivos para la provincia de Zamora Chinchipe en comparación con la provincia de Loja.

Se identificó mayor presencia de SARS-CoV-2 en murciélagos de la especie *Carollia sp.* Así mismo, la frecuencia de infección por otros coronavirus humanos, destacando los de mayor frecuencia son el CoV-NL63 y CoV-KHU1.

Los resultados de secuenciación obtenidos aportan información sobre la circulación de virus en Ecuador en animales silvestres. Dada la situación geográfica de las muestras, podemos especular, que la forma de contagio inter-especie de hombre-animal se realiza a través de un posible intermediario, y es mucho más común de lo que se piensa.

Una de las limitaciones destacadas en este estudio radica en la escasez de información disponible en términos de porcentajes, lo cual dificulta realizar comparaciones y discusiones adecuadas, especialmente en relación con esta especie, al momento de interpretar los resultados.

9. Recomendaciones

Es necesario fortalecer la vigilancia e investigación con enfoque “ONE HEALTH” para comprender la dinámica de transmisión del virus y desarrollar medidas de control efectivas, así como continuar monitoreando la prevalencia de la enfermedad en murciélagos y otros animales. Así mismo, seguir las pautas de las normativas internacionales para reducir el riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 de murciélagos a humanos.

Los resultados obtenidos en esta investigación podrían utilizarse por instituciones de control como AGROCALIDAD y Ministerio de Salud Pública para que puedan concientizar a los moradores de lugares cercanos a cavernas sobre la visita de estas cuevas ya que pueden ser un foco de contaminación para los usuarios. Además, proponer estrategias de conservación que eviten o disminuyan la pérdida de refugios, así como el sacrificio de murciélagos propios de la zona.

Se sugiere a la población en general que los murciélagos identificados como positivos a SARS-CoV-2, se les considere no causantes ni transmisores de la enfermedad COVID-19, ya que son reservorios naturales de este virus.

Indagar más en la investigación sobre reservorios naturales del SARS-CoV-2 en base a nuestra realidad y con nuestros recursos locales disponibles, sobre todo en animales silvestres, domésticos y de producción, predispuestos a la presencia de este tipo de coronavirus.

Por la calidad de las secuencias, se recomendaría que se investigue más a profundidad la relación de estos genomas con otras variantes de coronavirus que infectaron humanos y que son de interés (como por ejemplo Kent o B.1.1.7, variante sudafricana o B.1.351, variante brasileña o P.2 o la variante india o P.1). Es necesario analizar la relación que existiría entre todas ellas con los genomas del virus de los animales para aclarar un poco más el panorama.

10. Bibliografía

- Anthony, S. J., Ojeda-Flores, R., Rico-Chávez, O., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrelío, C. M., Rostal, M. K., Epstein, J. H., Tipps, T., Liang, E., Sanchez-Leon, M., Sotomayor-Bonilla, J., Aguirre, A. A., Ávila-Flores, R., Medellín, R. A., Goldstein, T., Suzán, G., Daszak, P., & Lipkin, W. I. (2013a). *Coronaviruses in bats from Mexico*. *The Journal of general virology*, 94(Pt 5), 1028–1038. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049759-0>
- 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., PREDICT Consortium, Mazet, J. A. K., & Goldstein, T. (2017b). *Global patterns in coronavirus diversity*. *Virus evolution*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vex012>
- Aksamentov I, Roemer C, Hodcroft E, Neher R. (2021). Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J Open Source Softw.* 6(67):3773. Doi: <https://doi.org/10.21105/joss.03773>
- Al-Sharif, E., Strianese, D., AlMadhi, N. H., D'Aponte, A., dell'Omo, R., Di Benedetto, R., & Costagliola, C. (2021). Ocular tropism of coronavirus (CoVs): a comparison of the interaction between the animal-to-human transmitted coronaviruses (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV, CoV-229E, NL63, OC43, HKU1) and the eye. *International ophthalmology*, 41(1), 349–362. <https://doi.org/10.1007/s10792-020-01575-2>
- Alekseev, K. P., Vlasova, A. N., Jung, K., Hasoksuz, M., Zhang, X., Halpin, R., Wang, S., Ghedin, E., Spiro, D., & Saif, L. J. (2008). Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *Journal of virology*, 82(24), 12422–12431. <https://doi.org/10.1128/JVI.01586-08>
- Almeida, J. D., & Tyrrell, D. A. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *The Journal of general virology*, 1(2), 175–178. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-1-2-175>

- Altringham, J. D., Senior, P., Ruckstuhl, K. E., & Neuhaus, P. (2005). Social systems and ecology of bats. Sexual segregation in vertebrates, 280-302. Link: Sexual Segregation in Vertebrates - Google Libros.
- Arias, E., Pacheco, V., Cervantes, K., Aguilar, A., & Álvarez, J. (2016). Diversidad y composición de murciélagos en los bosques montanos del Santuario Nacional Pampa Hermosa, Junín, Perú. *Revista peruana de biología*, 23(2), 103-116. Link: Diversidad y composición de murciélagos en los bosques montanos del Santuario Nacional Pampa Hermosa, Junín, Perú (scielo.org.pe)
- Astuti, I y Ysrafil (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 407-412. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.02>
- Athni, T. S., Shocket, M. S., Couper, L. I., Nova, N., Caldwell, I. R., Caldwell, J.M., Childress, J. N., Childs, M. L., De Leo, G. A., Kirk, D. G., MacDonald, A. J., Olivarius, K., Pickel, D. G., Roberts, S. O., Winokur, O.C., Young, H. S., Cheng, J., Grant, E. A., Kurzner, P.M., Kyaw, S., ... Mardoqueo, E. A. (2021). La influencia de las enfermedades transmitidas por vectores en la historia humana: mecanismos socioecológicos. *Cartas de ecología*, 24(4), 829–846. <https://doi.org/10.1111/ele.13675>
- Avetyan D., Chavushyan A., Ghazaryan H., Melkonyan A., Stepanyan A., Zakharyan R., Hayrapetyan V., Atshemyan S., Khachatryan G., Sirunyan T., Davitavyan S., Martirosyan G., MelikAndreasyan G., Sargsyan S., Ghazazyan A., Aleksanyan N., Yin X., & Arakelyan A. (2021). SARS-CoV-2 detection by extraction-free qRT-PCR for massive and rapid COVID-19 diagnosis during a pandemic in Armenia. *Journal of virological methods*, 295, 114199. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.11.4199>
- Barquez, R. M., Díaz, M. M., Montani, M. E., & Pérez, M. J. (2020). Nueva guía de los murciélagos de Argentina. *Publicación especial*, 3, 1-181.
- Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Johnsen, L. B., Helgstrand, C., Bak-Thomsen, T., Garred, P., & Skjoedt, M. O. (2021). The SARS-CoV-2 Y453F mink variant displays a pronounced increase in ACE-2 affinity but does not challenge antibody

neutralization. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100536.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100536>

- Benvenuto, D., Giovanetti, M., Ciccozzi, A., Spoto, S., Angeletti, S., & Ciccozzi, M. (2020). The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. *Journal of medical virology*, 92(4), 455–459. <https://doi.org/10.1002/jmv.25688>
- Berche, P. (2022). The enigma of the 1889 Russian flu pandemic: A coronavirus? *La Presse Médicale*, 51(3), 104111.
- Bonilla-Aldana, D. K., Jiménez-Díaz, S. D., Arango-Duque, J. S., Aguirre-Florez, M., Balbin-Ramon, G. J., Paniz-Mondolfi, A., ... & Rodríguez-Morales, A. J. (2021). Bats in ecosystems and their Wide spectrum of viral infectious potential threats: SARS-CoV-2 and other emerging viruses. *International Journal of Infectious Diseases*, 102, 87-96.
- Bosco-Lauth, A. M., Hartwig, A. E., Porter, S. M., Gordy, P. W., Nehring, M., Byas, A. D., VandeWoude, S., Ragan, I. K., Maison, R. M., & Bowen, R. A. (2020). Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(42), 26382–26388.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2013102117>
- Bosch, B. J., Van der Zee, R., De Haan, C. A., & Rottier, P. J. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of virology*, 77(16), 8801-8811.
- Burneo, S. F., & Tirira, D. G. (2014). Murciélagos del Ecuador: un análisis de sus patrones de riqueza, distribución y aspectos de conservación. *Therya*, 5(1), 197-228.
- Bracamonte, J. C. (2018). Protocolo de muestreo para la estimación de la diversidad de murciélagos con redes de niebla en estudios de ecología. *Ecología austral*, 28(2), 446-454.
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu,

- C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- Bundschuh, C., Egger, M., Wiesinger, K., Gabriel, C., Clodi, M., Mueller, T., & Dieplinger, B. (2020). Evaluation of the EDI enzyme linked immunosorbent assays for the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in human plasma. *Clínica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 509, 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.047>
- Cahan E. (2020). COVID-19 hits US mink farms after ripping through Europe. *Science*. 80 <https://www.sciencemag.org/news/2020/08/covid-19-hits-us-mink-farms-after-ripping-through-europe>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022a). Animals and COVID-19. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html>.
- Centers for Disease Control and Prevention (2019b). Novel Coronavirus Prevention & Treatment. Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/about/prevention-treatment.html>
<https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/helpful-questions-and-answers-about-coronavirus-covid-19-and-your-pets>.
- CDC COVID-19 Response Team (2021). SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant - United States, December 1-8, 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70(50), 1731–1734. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7050e1>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020>
- Crook, J. M., Murphy, I., Carter, D. P., Pullan, S. T., Carroll, M., Vipond, R., Cunningham, A. A., & Bell, D. (2021). Metagenomic identification of a new sarbecovirus from

horseshoe bats in Europe. *Scientific reports*, 11(1), 14723.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-94011-z>

- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews microbiology*, 17(3), 181-192. [10.1038/s41579-018-0118-9](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9)
- Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 221-236.
- Channappanavar, R., Zhao, J., & Perlman, S. (2014). T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunologic research*, 59, 118-128.
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, 92(4), 418-423.
- Cheng V.C.C., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. & Yuen K.Y, (2007), 'Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and re-emerging infection', *Clinical Microbiology Reviews* 20(4), 660–694. [10.1128/CMR.00023-07](https://doi.org/10.1128/CMR.00023-07)
- Cheever, F. S., Daniels, J. B., Pappenheimer, A. M., & Bailey, O. T. (1949). A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin: I. Isolation and biological properties of the virus. *The Journal of experimental medicine*, 90(3), 181.
- D. Katterine Bonilla-Aldana, S. Daniela Jimenez-Diaz, J. Sebastian Arango-Duque, Mateo Aguirre-Florez, Graciela J. Balbin-Ramon, Alberto Paniz-Mondolfi, Jose Antonio Suárez, Monica R. Pachar, Luis A. Pérez-García, Lourdes A. Delgado-Noguera, Manuel Antonio Sierra, Fausto Muñoz-Lara, Lysien I. Zambrano, Alfonso J. Rodriguez-Morales. Bats in ecosystems and their Wide spectrum of viral infectious potential threats: SARS-CoV-2 and other emerging viruses. *International Journal of Infectious Diseases*. Volume 102. 2021. Pages 87-96. ISSN 1201-9712. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.050>.
- Damas J, Hughes GM, Keough KC, Painter CA, Persky NS, Corbo M, Hiller M, Koepfli KP, Pfenning AR, Zhao H, et al. (2020). Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by

comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 117(36):22311–22322

Delaune, D., Hul, V., Karlsson, E. A., Hassanin, A., Ou, T. P., Baidaliuk, A., Gámbaro, F., Prot, M., Tu, V. T., Chea, S., Keatts, L., Mazet, J., Johnson, C. K., Buchy, P., Dussart, P., Goldstein, T., Simon-Lorière, E., & Duong, V. (2021). A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia. *Nature communications*, 12(1), 6563. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26809-4>

Dileepan, M., Di, D., Huang, Q., Ahmed, S., Heinrich, D., Ly, H., & Liang, Y. (2021). Seroprevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in pet cats and dogs in Minnesota, USA. *Virulence*, 12(1), 1597-1609.

Dhama, K., Patel, S. K., Kumar, R., Masand, R., Rana, J., Yattoo, M. I., Tiwari, R., Sharun, K., Mohapatra, R. K., Natesan, S., Dhawan, M., Ahmad, T., Emran, T. B., Malik, Y. S., & Harapan, H. (2021). The role of disinfectants and sanitizers during COVID-19 pandemic: advantages and deleterious effects on humans and the environment. *Environmental science and pollution research international*, 28(26), 34211–34228. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14429-w>

Ding X Liu, Jia Q Liang, and To S Fung, South China Agricultural University, Guangzhou, China. (2021) Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). Elsevier Ltd. All rights reserved. Chapter 21501 - Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae) (nih.gov)

Deng, J., Jin, Y., Liu, Y., Sun, J., Hao, L., Bai, J., Huang, T., Lin, D., Jin, Y., & Tian, K. (2020). Serological survey of SARS-CoV-2 for experimental, domestic, companion and wild animals excludes intermediate hosts of 35 different species of animals. *Transboundary and emerging diseases*, 67(4), 1745–1749. <https://doi.org/10.1111/tbed.13577>

Dewald Schoeman, Bianca Gordon, Burtram C. Fielding, *Coronaviruses*, Editor(s): Nima Rezaei, *Encyclopedia of Infection and Immunity*, Elsevier, (2022), Pages 241-258, ISBN 9780323903035. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00052-5>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187319000525>)

- di Mauro, G., Scavone, C., Rafaniello, C., Rossi, F., & Capuano, A. (2020). SARS-CoV-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. *International immunopharmacology*, 84, 106519.
- Díaz, M. M., S. Solari, L. F. Aguirre, L. Aguiar, y R. M. Barquez. (2016a). Clave de identificación de los murciélagos de Sudamérica. PCMA (Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina). Publicación Especial N° 2, 160 pp
- Díaz, M. M., Solari, S., Gregorin, R., Aguirre, L. F., & Barquez, R. M. (2021b). Clave de identificación de los murciélagos neotropicales.
- Díaz, M. M., Flores, D. A., & Barquez, R. M. (2002). A new species of gracile mouse opossum, genus *Gracilinanus* (Didelphimorphia: Didelphidae), from Argentina. *Journal of Mammalogy*, 83(3), 824-833.
- Dimonaco, N. J., Salavati, M., & Shih, B. B. (2020). Computational analysis of SARS-CoV-2 and SARS-like coronavirus diversity in human, bat and pangolin populations. *Viruses*, 13(1), 49.
- Docherty, A. B., Harrison, E. M., Green, C. A., Hardwick, H. E., Pius, R., Norman, L., Holden, K. A., Read, J. M., Dondelinger, F., Carson, G., Merson, L., Lee, J., Plotkin, D., Sigfrid, L., Halpin, S., Jackson, C., Gamble, C., Horby, P. W., Nguyen-Van-Tam, J. S., Ho, A., ... ISARIC4C investigators (2020). Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 369, m1985. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1985>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, 1-23.
- Eiros, J. M., & Hernández, M. (2022). La evolución en variantes del SARS-CoV-2 y su repercusión clínica y sanitaria. The evolution of SARS-CoV-2 variants and their clinical and healthcare implications. *Revista clínica española*, 222(7), 414–416. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2021.12.004>
- Enserink, M., & Kupferschmidt, K. (2020). With COVID-19, modeling takes on life and death importance. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6485), 1414–1415.

<https://doi.org/10.1126/science.367.6485.1414-b>

El Diario, (21 de marzo 2022). Emergencias relacionadas con animales aumentan el 23 % en Ecuador este 2022. El Diario. Recuperado el 11 de septiembre del 2023. Emergencias relacionadas con animales aumentan el 23 % en Ecuador este 2022 - El Diario Ecuador.

Eloit, M. (2020). Newly Discovered Bat Viruses Give Hints to Covid's Origins. SARS-CoV-2 related viruses from bats in Laos | Virology Blog: Newly Discovered Bat Viruses Give Hints to Covid's Origins - The New York Times ([nytimes.com](https://www.nytimes.com))

Falcón, A., Vázquez-Morón, S., Casas, I., Aznar, C., Ruiz, G., Pozo, F., ... & Echevarría, J. E. (2011). Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Archives of virology*, 156, 1883-1890.

Ferasin, L., Fritz, M., Ferasin, H., Becquart, P., Legros, V., & Leroy, E. M. (2021). Myocarditis in naturally infected pets with the British variant of COVID-19. *BioRxiv*, 2021-03.

Franklin, A. B., & Bevins, S. N. (2020). Spillover of SARS-CoV-2 into novel wild hosts in North America: A conceptual model for perpetuation of the pathogen. *The Science of the total environment*, 733, 139358. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139358>

Friedrich-Loeffler-Institut. (2020). Novel Coronavirus SARSCoV-2: fruit bats and ferrets are susceptible; pigs and chickens are not. [accessed 2020 Jun 30]. Available at: <https://www.fli.de/en/press/press-releases/press-singleview/novel-coronavirus-sars-cov-2-fruit-bats-and-ferretsare-susceptible-pigs-and-chickens-are-not/>

Friedman, N., Alter, H., Hindiyeh, M., Mendelson, E., Shemer Avni, Y., & Mandelboim, M. (2018). Human Coronavirus Infections in Israel: Epidemiology, Clinical Symptoms and Summer Seasonality of HCoV-HKU1. *Viruses*, 10(10), 515.

<https://doi.org/10.3390/v10100515>

Frick, W. F., Kingston, T., & Flanders, J. (2020). A review of the major threats and challenges to global bat conservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1469(1), 5-25.

- Fouchier R.A.M., Kuiken T., Schutten M., Van Amerongen G., Van Doornum G.J.J, Van Den Hoogen B.G., et al., (2003), 'Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus', *Nature* 423(6937), 240 10.1038/423240a
- Frustagli, S. A. (2020). Abordajes disciplinares sobre el COVID-19.
- Galloway, S. E., Paul, P., MacCannell, D. R., Johansson, M. A., Brooks, J. T., MacNeil, A., Slayton, R. B., Tong, S., Silk, B. J., Armstrong, G. L., Biggerstaff, M., & Dugan, V. G. (2021). Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70(3), 95–99. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e2>
- Gaudioso, P. J. (2019). Morfología y morfometría del esqueleto postcraneal de murciélagos (Mammalia: Chiroptera) de Argentina. Tucuman: Programa Investig Biodivers Argent (PIDBA), *Publ Espec*, 2.
- Gaudreault, N. N., Cool, K., Trujillo, J. D., Morozov, I., Meekins, D. A., McDowell, C., Bold, D., Carossino, M., Balaraman, V., Mitzel, D., Kwon, T., Madden, D. W., Artiaga, B. L., Pogranichniy, R. M., Roman-Sosa, G., Wilson, W. C., Balasuriya, U. B. R., García-Sastre, A., & Richt, J. A. (2021). Susceptibility of sheep to experimental co-infection with the ancestral lineage of SARS-CoV-2 and its alpha variant. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2021.11.15.468720. Susceptibility of sheep to experimental co-infection with the ancestral lineage of SARS-CoV-2 and its alpha variant | *bioRxiv*
- Ge, X. Y., Wang, N., Zhang, W., Hu, B., Li, B., Zhang, Y. Z., ... & Shi, Z. L. (2016). Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virological Sinical*, 31, 31-40.
- GISAID. (2020). Clade and lineage nomenclature aids in genomic epidemiology studies of active hCoV-19 viruses [Internet]. Available from: GISAID - Clade and lineage nomenclature aids in genomic epidemiology of active hCoV-19 viruses
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., ... & Ziebuhr, J. (2020). Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. *BioRxiv*.

- Greenough T.C., Carville A., Coderre J., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K. et al., (2005), 'Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus', *American Journal of Pathology* 167(2), 455–463. [10.1016/S0002-9440\(10\)62989-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62989-6)
- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., Liu, L., Shan, H., Lei, C. L., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L. J., Zeng, G., Yuen, K. Y., Chen, R. C., Tang, C. L., Wang, T., Chen, P. Y., Xiang, J., Li, S. Y., ... China Medical Treatment Expert Group for Covid-19 (2020a). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England journal of medicine*, 382(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Guan, Y., Zheng, B. J., He, Y. Q., Liu, X. L., Zhuang, Z. X., Cheung, C. L., Luo, S. W., Li, P. H., Zhang, L. J., Guan, Y. J., Butt, K. M., Wong, K. L., Chan, K. W., Lim, W., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Peiris, J. S., & Poon, L. L. (2003b). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5643), 276–278. <https://doi.org/10.1126/science.1087139>
- Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F., Dela Cruz, C. S., Wang, Y., Wu, C., Xiao, Y., Zhang, L., Han, L., Dang, S., Xu, Y., Yang, Q. W., Xu, S. Y., Zhu, H. D., Xu, Y. C., Jin, Q., Sharma, L., ... Wang, J. (2020). Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 778–785. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>
- Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 121(1), 190-193.
- Hasoksuz, M., Sreevatsan, S., Cho, K. O., Hoet, A. E., & Saif, L. J. (2002). Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus research*, 84(1-2), 101-109.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and

Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>

Holmes EC, et al. (2021). The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*.; doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017.

Hobbs EC, Reid TJ. (2021). Animals and SARS-CoV-2: Species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and the potential implications for community transmission. *Transbound Emerg Dis*; 68:1850-1867. [doi:10.1111/tbed.13885](https://doi.org/10.1111/tbed.13885)

Hu B, Zeng L-P, Yang X-L, Ge X-Y, Zhang W. (2017). Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLOS Pathog*. 13(11):e1006698

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395(10223):497–506.

Hutson, A. M., & Mickleburgh, S. P. (Eds.). (2001). *Microchiropteran bats: global status survey and conservation action plan* (Vol. 56). IUCN.

Infantino, M., Grossi, V., Lari, B., Bambi, R., Perri, A., Manneschi, M., ... & Manfredi, M. (2020). Diagnostic accuracy of an automated chemiluminescent immunoassay for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies: an Italian experience. *Journal of medical virology*, 92(9), 1671-1675.

Instituto Geofísico Militar Ecuador., (1928). Ubicación geográfica de la ciudad de Loja. Ubicación geográfica | Municipio de Loja.

Ismail, M. M., Cho, K. O., Hasoksuz, M., Saif, L. J., & Saif, Y. M. (2001). Antigenic and genomic relatedness of turkey-origin coronaviruses, bovine coronaviruses, and infectious bronchitis virus of chickens. *Avian diseases*, 978-984.

Jacob, J. J., John Fletcher, G., Monisha Priya, T., Veeraraghavan, B., & Mutreja, A. (2021). Relevance of immune response and vaccination strategies of SARS-CoV-2 in the phase of viral red queen dynamics. *Indian journal of medical microbiology*, 39(4), 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.08.001>

- Jackson, B., Boni, M. F., Bull, M. J., Colleran, A., Colquhoun, R. M., Darby, A. C., Haldenby, S., Hill, V., Lucaci, A., McCrone, J. T., Nicholls, S. M., O'Toole, Á., Pacchiarini, N., Poplawski, R., Scher, E., Todd, F., Webster, H. J., Whitehead, M., Wierzbicki, C., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, ... Rambaut, A. (2021). Generation and transmission of interlineage recombinants in the SARS-CoV-2 pandemic. *Cell*, 184(20), 5179–5188.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.014>
- Jackwood, M. W. (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian diseases*, 56(4), 634-641.
- Janice Oh, H. L., Ken-En Gan, S., Bertoletti, A., & Tan, Y. J. (2012). Understanding the T cell immune response in SARS coronavirus infection. *Emerging microbes & infections*, 1(1), 1-6.
- Juste-Ballesta, J., Figueras-Huerta, A., y Echevarria, J. E. (2020). Los murciélagos, las otras víctimas del SARS-CoV-2.
- Katze, M. (2012). Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(1), 16-32.
- Khalil, O. A. K., & da Silva Khalil, S. (2020). SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição. *Revista de Medicina*, 99(5), 473-479.
- Khan Sharun, Kuldeep Dhama, Abhijit M. Pawde, Christian Gortázar, Ruchi Tiwari, D. Katterine Bonilla-Aldana, Alfonso J. Rodriguez-Morales, José de la Fuente, Izabela Michalak & Youssef A. Attia (2021) SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications, *Veterinary Quarterly*, 41:1, 181-201, DOI: 10.1080/01652176.2021.1921311
- Konradt, C., & Hunter, C. A. (2018). Pathogen interactions with endothelial cells and the induction of innate and adaptive immunity. *European journal of immunology*, 48(10), 1607-1620.
- Kozel, T. R., & Burnham-Marusich, A. R. (2017). Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Past, Present, and Future. *Journal of clinical microbiology*, 55(8), 2313–2320. <https://doi.org/10.1128/JCM.00476-17>

- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Host immune response and immunobiology of human SARS-CoV-2 infection. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics*, 43-53.
- Kunz, T. H., Lumsden, L. F., & Fenton, M. B. (2003). Ecology of cavity and foliage roosting bats. *Bat ecology*, 1, 3-89.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., Wong, S. S., Leung, S. Y., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 14040–14045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
- Lauer, S. A., Grantz, K. H., Bi, Q., Jones, F. K., Zheng, Q., Meredith, H. R., Azman, A. S., Reich, N. G., & Lessler, J. (2020). The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of internal medicine*, 172(9), 577–582. <https://doi.org/10.7326/M20-0504>
- LePan. (2020). Visualizing the history of pandemics. *Visual Capitalist 2020*; March 14. <https://www.visualcapitalist.com/history-of-pandemics-deadliest/>.
- Li, F. (2015a). Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *Journal of virology*, 89(4), 1954–1964. <https://doi.org/10.1128/JVI.02615-14>
- Li X, Zai J, Zhao Q, Nie Q, Li Y. (2020b). Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology 2020*: 1-10. doi: 10.1002/jmv.25731
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C. (2005c). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310(5748):676–79
- Lisón, F., Aledo, E., & Calvo, J. F. (2011). Los murciélagos (Mammalia: Chiroptera) de la Región de Murcia (SE España): distribución y estado de conservación. In *Anales de Biología* (No. 33, pp. 79-92). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.

- Liu, Zhonghua, Xing Bing y Xue Za Zhi. (2020a). Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention = Zhonghua liuxingbingxue zazhi, 41(2), 145–151. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003>
- Liu DX, Liang JQ, Fung TS. (2021b). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). Encyclopedia of Virology. 2021:428–40. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X. PMID: PMC7204879.
- Long, Q. X., Tang, X. J., Shi, Q. L., Li, Q., Deng, H. J., Yuan, J., Hu, J. L., Xu, W., Zhang, Y., Lv, F. J., Su, K., Zhang, F., Gong, J., Wu, B., Liu, X. M., Li, J. J., Qiu, J. F., Chen, J., & Huang, A. L. (2020). Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. Nature medicine, 26(8), 1200–1204. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
- Luan J, Lu Y, Jin X, Zhang L. (2020b). Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. Biochem Biophys Res Commun. 526(1):165–169. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32201080; PMID: PMC7102515
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B. (2020). Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The Lancet; 95 (10224): 565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8 35.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, y AGROCALIDAD. (2016). Manual de Procedimientos para la Prevención y Control de Rabia Bovina en el Ecuador.
- Males Andocilla, S. N. (2019). Caracterización morfológica y morfométrica del Murciélago lengua larga común *Glossophaga soricina* en Ecuador (Chiroptera: Phyllostomidae) (Bachelor's thesis, PUCE-Quito).
- Malik Y. A. (2020). Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. The Malaysian journal of pathology, 42(1), 3–11.

- Martina B.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Van Amerongen G. et al., (2003), 'Virology: SARS virus infection of cats and ferrets', *Nature* 425(6961), 915 10.1038/425915^a
- Martínez, R., Jørgensen, P. M., & Tiessen, H. (2012). Cambio climático y biodiversidad en los Andes tropicales (pp. 235-253). S. K. Herzog (Ed.). MacArthur Foundation.
- Mallapaty S. (2020). Coronavirus can infect cats - dogs, not so much. *Nature*, 10.1038/d41586-020-00984-8. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00984-8>
- Meekins, D. A., Morozov, I., Trujillo, J. D., Gaudreault, N. N., Bold, D., Carossino, M., ... & Richt, J. A. (2020). Susceptibility of swine cells and domestic pigs to SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 2278-2288.
- Menachery, V. D., Yount, B. L., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L. E., Plante, J. A., ... & Baric, R. S. (2015). A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature medicine*, 21(12), 1508-1513.
- Mertens, P., De Vos, N., Martiny, D., Jassoy, C., Mirazimi, A., Cuypers, L., Van den Wijngaert, S., Monteil, V., Melin, P., Stoffels, K., Yin, N., Mileto, D., Delaunoy, S., Magein, H., Lagrou, K., Bouzet, J., Serrano, G., Wautier, M., Leclipteux, T., Van Ranst, M., ... LHUB-ULB SARS-CoV-2 Working Diagnostic Group (2020). Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip Diagnostic Assay in a Pandemic Context. *Frontiers in medicine*, 7, 225. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00225>
- Ministerio del Ambiente. (2015). Sistema nacional de Áreas Protegidas del Ecuador. Versión en línea: <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/todas-areas-protegidas> [15 julio 2020].
- Ministerio de Salud Pública, (29 de marzo del 2020). Actualización de casos de coronavirus en Ecuador. Ministerio de Salud Pública. Recuperado el 13 de marzo del 2020 de Actualización de casos de coronavirus en Ecuador – Ministerio de Salud Pública.
- Milewska, A., Nowak, P., Owczarek, K., et al., (2018). Entry of human coronavirus NL63 into the cell. *Journal of Virology* 92. doi:10.1128/JVI.01933-17.

- Montesinos, I., Gruson, D., Kabamba, B., Dahma, H., Van den Wijngaert, S., Reza, S., Carbone, V., Vandenberg, O., Gulbis, B., Wolff, F., & Rodriguez-Villalobos, H. (2020). Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 128, 104413. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104413>
- MOORE, B. (2020). Síndrome de liberação de citocina em COVID-19 grave. *Science*, 368(1), 473.
- Mousavizadeh, L., & Ghasemi, S. (2021). Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(2), 159-163.
- Munir K, Ashraf S, Munir I, Khalid H, Muneer MA, Mukhtar N, y col. (2020). Zoonotic and reverse zoonotic events of SARS-CoV-2 and their impact on global health. *Emerg Microbes Infect.* 9:2222-2235. doi:10.1080/22221751.2020.1827984
- Murakami, S., Kitamura, T., Suzuki, J., Sato, R., Aoi, T., Fujii, M., Matsugo, H., Kamiki, H., Ishida, H., Takenaka-Uema, A., Shimojima, M., & Horimoto, T. (2020). Detection and Characterization of Bat Sarbecovirus Phylogenetically Related to SARS-CoV-2, Japan. *Emerging infectious diseases*, 26(12), 3025–3029. <https://doi.org/10.3201/eid2612.203386>
- Neira, E. (2014). La ecolocalización en los murciélagos. Disponible en: <http://granplaneta.com/animales/la-ecolocacion-en-los-murcielagos/>
- Nenasheva, T., Gerasimova, T., Serdyuk, Y., Grigor'Eva, E., Kosmiadi, G., Nikolaev, A., ... & Lyadova, I. (2020). Macrophages derived from human induced pluripotent stem cells are low-activated “naïve-like” cells capable of restricting mycobacteria growth. *Frontiers in immunology*, 11, 1016.
- Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella, D., Baksh, M. F., Connelly, S., ... & Buchmeier, M. J. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of structural biology*, 174(1), 11-22.

- Novelli, D. (2020). Un equipo de investigadores detectó coronavirus en murciélagos. Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional, DG-SICyP, INTA. RIA_2020_VOLUMEN46_N°1_p.8-11.pdf (inta.gob.ar). Link: nota_2_daniela_novelli.pdf (inta.gob.ar) 335290374.pdf (core.ac.uk)
- Nextstrain. (2021). Genomic epidemiology of novel coronavirus - Global subsampling [Internet]. Disponible en: <https://bit.ly/3K9UPc0>
- Olival KJ, Cryan PM, Amman BR, Baric RS, Blehert DS, Brook CE, et al. (2020) Possibility for reverse zoonotic transmission of SARS-CoV-2 to free-ranging wildlife: A case study of bats. *PLoS Pathog* 16(9): e1008758. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008758>
- Oreshkova N, Molenaar RJ, Vreman S, Harders F, Oude MBB, Hakze-van der Honing RW, Gerhards N, Tolsma P, Bouwstra R, Sikkema RS, Tacken MG, et al. (2020). SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill.* 25(23):2001005. PMID: 32553059; PMCID: PMC7403642
- Organización Mundial de la Salud (2020a). Reseña normativa de la OMS: Manejo clínico de la COVID-19, 14 de septiembre de 2022. Link: Reseña normativa de la OMS: Manejo clínico de la COVID-19, 14 de septiembre de 2022 (who.int)
- OMS (2023b). Actualización de casos de coronavirus en Ecuador. Link: R Graphics Output (salud.gob.ec)
- Ossa, G., Forero, L., Novoa, F., & Bonacic, C. (2015). Caracterización morfológica y bioacústica de los murciélagos (Chiroptera) de la Reserva Nacional Pampa de Tamarugal. *Biodiversidata*, 3, 21-29.
- Ong SWX, Tan YK, Chia PY, Lee TH, Ng OT et al. (2020). Air, surface environmental, and personal protective equipment contamination by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient. *Jama*: E1-E3. doi: 10.1001/jama.2020.3227 45.

- Ou X., Guan, H., Qin, B., et al., (2017). Crystal structure of the receptor binding domain of the spike glycoprotein of human betacoronavirus HKU1. *Nature Communications* 8, 15216. doi:10.1038/ncomms15216.
- Oude Munnink, B.B., Nieuwenhuijse, D.F., et al. (2020) Rapid SARS-CoV-2 Whole-Genome Sequencing and Analysis for Informed Public Health Decision- Making in the Netherlands. *Nature Medicine*, 26, 1405-1410. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0997-y>
- Pech-Canche, J. M., MacSwiney, C., & Estrella, E. (2010). Importancia de los detectores ultrasónicos para mejorar los inventarios de murciélagos Neotropicales. *Therya*, 1(3), 221-227.
- Pérez SM, Lopez FC, Dieste VB, JÁ Sánchez, S González, JG Goñi, LJD Rodríguez. (2020). Coronavirus: el salto Inter-especie como mecanismo de diseminación. colvema.org/revista/Colvema94/index.html
- Periodista digital, (01 de marzo de 2021). COVID-19: ¿cómo llegó el virus a Ecuador? Ecuavisa. Recuperado el 20 de agosto del 2023, de COVID-19: ¿cómo llegó el virus a Ecuador? (ecuavisa.com)
- Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature reviews microbiology*, 7(6), 439-450.
- Quintana, H., y Pacheco, V. (2007). Identificación y distribución de los murciélagos vampiros del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 24(1), 81-88.
- Rahalkar, M. C. & Bahulikar, R. A. (2020). Lethal pneumonia cases in Mojiang miners (2012) and the mineshaft could provide important clues to the origin of SARS-CoV-2. *Front. Public Health* <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.581569>
- Richardson, S., Hirsch, J. S., Narasimhan, M., Crawford, J. M., McGinn, T., Davidson, K. W., the Northwell COVID-19 Research Consortium, Barnaby, D. P., Becker, L. B., Chelico, J. D., Cohen, S. L., Cookingham, J., Coppa, K., Diefenbach, M. A., Dominello, A. J., Duer-Hefe, J., Falzon, L., Gitlin, J., Hajizadeh, N., Harvin, T. G., ... Zanos, T. P. (2020). Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes

Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*, 323(20), 2052–2059. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>

Rizo-Aguilar, Areli & Avila-Torresagaton, Luis & Vargas, Liliana & Lara, Ana & Nuñez, Gabriela & Miranda, Sergio. (2015). Técnicas para el estudio de los murciélagos.

Rivera-Parra, Pamela, & Burneo, Santiago F. (2013). Primera biblioteca de llamadas de ecolocalización de murciélagos del Ecuador. *Scielo Anlytics. Therya*, 4(1), 79-88. <https://doi.org/10.12933/therya-13-104>

Roberts A.L., Vogel J., Guarner N., Hayes N., Murphy B., Zaki S. et al., (2005). ‘Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters’, *Journal of Virology* 79(1), 503–511. 10.1128/JVI.79.1.503-511.2005

Rochman, N. D., Wolf, Y. I., Faure, G., Mutz, P., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2021). Ongoing global and regional adaptive evolution of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(29), e2104241118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104241118>

Rodales, A. L., & Juri, E. (2006). Grupo de Investigación de los Murciélagos. *Boletín Electrónico*, 2(3).

Rodríguez-Posada, M. E., & Ramírez-Chaves, H. E. (2012). Distribución, morfología y reproducción del murciélago rayado de orejas amarillas *Vampyriscus nymphaea* (Mammalia: Chiroptera) en Colombia. *Acta zoológica mexicana*, 28(2), 341-352.

Sharun, K., Dhama, K., Pawde, A. M., Gortázar, C., Tiwari, R., Bonilla-Aldana, D. K., Rodriguez-Morales, A. J., de la Fuente, J., Michalak, I., & Attia, Y. A. (2021). SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *The veterinary quarterly*, 41(1), 181–201.

<https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1921311>

Schirtzinger, E. E., Kim, Y., & Davis, A. S. (2022). Improving human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) research comparability in studies using HCoV-OC43 as a surrogate for SARS-CoV-2. *Journal of virological methods*, 299, 114317. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114317>

- Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schön, J., Sehl, J., Wylezich, C., ... & Beer, M. (2020). SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *The Lancet Microbe*, 1(5), e218-e225.
- Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*, 16(1), 1-22.
- Shah, V. K., Firmal, P., Alam, A., Ganguly, D., & Chattopadhyay, S. (2020). Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons from the Past. *Frontiers in immunology*, 11, 1949. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01949>
- Sharun, K., Dhama, K., Pawde, A. M., Gortázar, C., Tiwari, R., Bonilla-Aldana, D. K., Rodriguez-Morales, A. J., de la Fuente, J., Michalak, I., & Attia, Y. A. (2021). SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *The veterinary quarterly*, 41(1), 181–201. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1921311>
- Sharma, A., Ahmad Farouk, I., & Lal, S. K. (2021). COVID-19: A Review on the Novel coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*, 13(2), 202. <https://doi.org/10.3390/v13020202>
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Simmons, N. B., & Cirranello, A. L. (2020). Bat species of the world: a taxonomic and geographic database [online]: Available from <https://batnames.org/>.
- Solari, S. (2007a). Guía de campo de los Mamíferos del Ecuador. *Mastozoología neotropical*, 14(2), 300-302.
- Solari, S., & Martínez-Arias, V. (2014b). Cambios recientes en la sistemática y taxonomía de murciélagos Neotropicales (Mammalia: Chiroptera). *Therya*, 5(1), 167-196.
- Song, H. D., Tu, C. C., Zhang, G. W., Wang, S. Y., Zheng, K., Lei, L. C., ... & Zhao, G. P. (2005). Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm

civet and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), 2430-2435.

Susan M. Poutanen, 222 - Human Coronaviruses, Editor(s): Sarah S. Long, Charles G. Prober, Marc Fischer, *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*, Elsevier, (2018a), Pages 1148-1152.e3, ISBN 9780323401814, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00222-X>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032340181400222X>)

Susan R. Weiss, Julián L. Leibowitz, Chapter 4 - Coronavirus Pathogenesis, Editor(s): Karl Maramorosch, Aaron J. Shatkin, Frederick A. Murphy, *Advances in Virus Research*, Academic Press, Volume 81, (2011b), Pages 85-164, ISSN 0065-3527, ISBN 9780123858856, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123858856000092>)

Tang, X. C., Zhang, J. X., Zhang, S. Y., Wang, P., Fan, X. H., Li, L. F., ... & Guan, Y. (2006). Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *Journal of virology*, 80(15), 7481-7490.

Team, E. (2020). The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19)—China, 2020. *China CDC weekly*, 2(8), 113.

Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., Preiser, W., ... de Oliveira, T. (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592(7854), 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>

Tekes, G., & Thiel, H. J. (2016). Feline coronaviruses: pathogenesis of feline infectious peritonitis. *Advances in virus research*, 96, 193-218.

Tirira, D. (2007a). *Guía de campo de los mamíferos del Ecuador*. Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 6. Quito. 576 pp

- Tirira, D. (2021b). Mamíferos ecuatorianos en museos de historia natural y colecciones científicas: 7. El Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid. Boletín Técnico, Serie Zoológica, 15(16), 18-54.
- Tirira, D. G. (2012c). Murciélagos del Ecuador: una referencia geográfica, taxonómica y bibliográfica. BORRADOR, 233.
- Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *British medical journal*, 1(5448), 1467
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., & Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine*, 10(4), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
- Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? *Current biology*, 27(14), R713-R715.
- Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J. C., Johnson, R., Geidelberg, L., Hinsley, W. R., Laydon, D. J., Dabrera, G., O'Toole, Á., Amato, R., Ragonnet-Cronin, M., Harrison, I., Jackson, B., Ariani, C. V., Boyd, O., Loman, N. J., McCrone, J. T., Gonçalves, S., Jorgensen, D., ... Ferguson, N. M. (2021). Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*, 593(7858), 266–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03470-x>
- Vlasova, A. N., Zhang, X., Hasoksuz, M., Nagesha, H. S., Haynes, L. M., Fang, Y., ... & Saif, L. J. (2007). Two-way antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and group 1 animal CoVs is mediated through an antigenic site in the N-terminal region of the SARS-CoV nucleoprotein. *Journal of virology*, 81(24), 13365-13377.
- Wacharapluesadee, S., Tan, C. W., Maneorn, P., Duengkae, P., Zhu, F., Joyjinda, Y., Kaewpom, T., Chia, W. N., Ampoot, W., Lim, B. L., Worachotsueptrakun, K., Chen, V. C., Sirichan, N., Ruchisrisarod, C., Rodpan, A., Noradechanon, K., Phaichana, T., Jantararat, N., Thongnumchaima, B., Tu, C., ... Wang, L. F. (2021). Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast

Asia. *Nature communications*, 12(1), 972. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21240-1>

- Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of Virology*; 94 (7): 1-9. doi:10.1128/JVI.00127-20
- Wang F, Hou H, Luo Y, Tang G, Wu S, Huang M (2020a). The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. *JCI Insight* 2020;5(10): e137799.
- Wang, F., Nie, J., Wang, H., Zhao, Q., Xiong, Y., Deng, L., ... & Zhang, Y. (2020b). Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *The Journal of infectious diseases*, 221(11), 1762-1769.
- Watanabe, S., Masangkay, J. S., Nagata, N., et al. (2010). Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis* 16, 1217–1223.
- Wei, D., Fan, W. L., & Xu, Y. (2021). Identification of water-soluble peptides in distilled spent grain and its angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity based on UPLC-Q-TOF-MS and proteomics analysis. *Food Chemistry*, 353, 129521.
- Weingartl H.M., Copps J., Drebot M.A., Marszal P., Smith G., Gren J. et al., (2004), ‘Susceptibility of pigs and chickens to SARS coronavirus’, *Emerging Infectious Diseases* 10(2), 179–184. 10.3201/eid1002.030677
- Wilchis, R. L. (2004). La tecnología y su uso en el estudio de los murciélagos. *TecnoCultura*, 3-3.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lau, C. C., Tsang, A. K., Lau, J. H., ... & Yuen, K. Y. (2012a). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of virology*, 86(7), 3995-4008.

- Woo, P. C., Lau, S. K., Li, K. S., Poon, R. W., Wong, B. H., Tsoi, H. W., ... & Yuen, K. Y. (2006b). Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*, 351(1), 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.041>
- World Health Organization. (2019a). Taking a multisectoral one health approach: a tripartite guide to addressing zoonotic diseases in countries. Food & Agriculture Org. Disponible en: <http://www.who.int> [Links]
- WHO. (2021b). Infección por SARS-CoV-2 en animales. Disponible en: <https://www.oie.int/es/documento/ficha-tecnica-de-enfermedad-infeccion-porsars-cov-2-en-animales/>
- Wong, G., Bi, Y. H., Wang, Q. H., Chen, X. W., Zhang, Z. G., & Yao, Y. G. (2020). Zoonotic origins of human coronavirus 2019 (HCoV-19/SARS-CoV-2): why is this work important? *Zoological research*, 41(3), 213.
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*; 579, 265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
- Xin Li, Hayes K.H. Luke, Susanna K.P. Lau, Patrick C.Y. Woo, *Human Coronaviruses: General Features, Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, (2019), ISBN 9780128012383. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383957040>
- Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 8(4):420–422.
- Yáñez, P. (2016). Las áreas naturales protegidas del Ecuador: características y problemática general. *Qualitas*, 11, 41-55.
- Ye Z., Yuan S., Yuen K., Fung S., Chan C. & Jin D, (2020), ‘Zoonotic origins of human coronaviruses’, *Review International Journal of Biological Science* 16(10), 1686–1697. 10.7150/ijbs.45472
- Yuan, L., Chen, Z., Song, S., Wang, S., Tian, C., Xing, G., Chen, X., Xiao, Z. X., He, F., & Zhang, L. (2015). p53 degradation by a coronavirus papain-like protease suppresses

type I interferon signaling. *The Journal of biological chemistry*, 290(5), 3172–3182.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619890>

Zhang, Y., Xu, J., Jia, R., Yi, C., Gu, W., Liu, P., ... & Sun, B. (2020a). Protective humoral immunity in SARS-CoV-2 infected pediatric patients. *Cellular & molecular immunology*, 17(7), 768-770.

Zhang, Y. Z., & Holmes, E. C. (2020b). A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, 181(2), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>

Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Shi, Z. L. (2020a). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 579(7798), 270-273.

Zhou, H., Ji, J., Chen, X., Bi, Y., Li, J., Wang, Q., Hu, T., Song, H., Zhao, R., Chen, Y., Cui, M., Zhang, Y., Hughes, A. C., Holmes, E. C., & Shi, W. (2021b). Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell*, 184(17), 4380–4391.e14.

Zeng, Z.-Q., Chen, D.-H., Tan, W.-P., et al., (2018). Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: A study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 37, 363. doi:10.1007/s10096017–3144-z

11. Anexos

Anexo 1. Protocolo de identificación de especies en murciélagos.

PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Libro Tirira, 2007 y Neotropicales Diaz *et al* 2016

Marcaje: pintar pulgar de las alas o garras

Fecha:

Localidad:

Hábitat:

Fase lunar:

Tiempo de apertura:

Tiempo de cierre:

Coordenadas geográficas:

Información ecológica:

Abreviaturas

CRm: Condición reproductiva macho

CRh: Condición reproductiva hembra

Pal: Presencia de alas pterigoideas

Pu: Presencia de uropatagio

Es: Escrotales

In: Inguinales

Im: Impalpables

Pp: Presencia de pezones

Lact: Lactante

NTAc: Número total de animales capturados





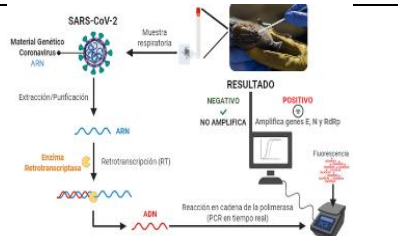
Código	Especie	Familia	Hora	N de red	Sexo	Edad	CRm			CRh			Peso	Pal	Pu	Cola
							Es	In	Im	Pp	Lact	P-lact				
NTAc																

N falanges	Borde labios	Forma de orejas	Hoja nasal			Color	Pulgar	Observaciones
			D	R	A			

Abreviaturas
 D: Desarrollada
 R: Rudimentaria
 A: Alargada

Adaptado de Tirira (2007) y Diaz *et al.*, (2021)

Anexo 2. Protocolo para toma de muestras en murciélagos.

<p>Bioseguridad</p> 	<p>Equipos de protección personal</p> <p>Overol, mascarilla, gorra, guantes, botas, gafas</p> <p>Equipo para la contención de animales</p> <p>Red de aluminio, red de fibra, bolsas térmicas</p> <p>Identificación de animal y de la muestra</p> <p>Pintar pulgar o alas, etiquetado de la muestra</p> <p>Descarte de material</p> <p>Bolsas rotuladas como “infeccioso” o cajas recolectoras de material cortopunzante.</p> <p>Desinfección</p> <p>Bomba de 10 litro con amonio cuaternario al 10% (1.5ml/lit)</p>
<p>Material para toma de muestras</p> 	<p>Del sistema respiratorio</p> <p>Hisopos nasofaríngeos plástico punta rayón, Hisopos nasofaríngeos punta algodón, Tubos falcon 15cm con medio Eagle modificado de Dulbecco (D MEM)</p>
<p>Procedimiento</p> 	<p>Se gira el hisopo por varias ocasiones dentro del hocico. Las muestras se colocaron en tubos falcon con medio medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), cortando la parte sobresaliente del hisopo para cerrar el criovial y se conservaron a una temperatura de -4°C dentro de un cooler.</p>
<p>Temperatura de la muestra</p> 	<p>Transporte</p> <p>Refrigerada 2°C a 8°C</p> <p>Bolsa hermética, papel absorbente, codificar, pilas de hielo/gel refrigerante, cooler</p> <p>Tiempo crítico para llegar al laboratorio</p> <p>Hasta 48 horas</p> <p>Bolsa hermética, papel absorbente, codificar, pilas de hielo/gel refrigerante, cooler</p>
<p>Exámenes</p> 	<p>Identificación de virus</p> <p>SARS-COV-2 y otros Coronavirus como HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-229E y HCoV-OC43.</p> <p>Secuenciación: identificación de 3 genes ORF1a, S, N</p>

Adaptado de AGROCALIDAD Y MAGAP, (2016)

Anexo 3. Protocolo para captura de murciélagos.

Riesgo biológico Sí No Radioisótopo
Sí No Químico carcinógeno Sí No
Agente: Dulbecco's Modified Eagle Medium
(DMEM)

1. Investigador: Rodrigo Cisneros PhD
Departamento: Ciencias Biológicas Teléfonos:
099 343 5507
Co-investigador: Blgo. Mastozoólogo Víctor
Romero Departamento: Curador de la colección de
Mamíferos de Museo de Zoología de la UTPL. Los
teléfonos: 098 353 9570.
Tutor: Jorge Armijos PhD Departamento:
Docente Investigador de Genética, Biología
Molecular y Celular de la UNL. Los teléfonos: 098
596 9186. Alumno: MVZ. Gabriela Parra
Departamento: Estudiante de la Maestría Sanidad
Animal de la UNL. Los teléfonos: 098 508 3524.

2. Especies (nombres comunes/cantidad estimada)

Las especies que intentaremos capturar utilizando técnicas de redes de niebla son *Desmodus rotundus*, *Carollia sp.*, *Carollia perspicillata* y *Anoura geoffroyi*. Esperamos capturar entre 5 -10 individuos de esta especie por dormidero identificado en el bosque o cavernas. Esperamos visitar un máximo de 2 dormideros.

3. Ubicación del alojamiento para animales

Edificio () Caseta ()
Bosque () Caverna ()
Habitación () Ríos ()

4. Duración propuesta del proyecto

2 meses () 1 año ()
4 meses () 1 año y medio ()
6 meses () 2 años ()

5. Números de propuesta: 1

6. Números de presupuesto: \$ 2 500, 00

7. Título del proyecto o nombre: DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS DE LA FAMILIA CORONAVIRIDAE EN QUIROPTEROS URBANOS DE LAS PROVINCIAS DE LOJA Y ZAMORA CHINCHIPE.

8. Extracto del Plan de Investigación/Enseñanza para la Información del Personal de Cuidado Animal

Estaremos capturando murciélagos utilizando procedimientos estándar de redes de niebla (American Society of Mammologists, 2016). Después de extraer rápida y cuidadosamente cada murciélago de la red, se colocará en una bolsa de tela suave hasta su procesamiento (10 minutos como máximo). Cada murciélago se sacará de la bolsa de tela y se identificará por especie.

Cada murciélago se procesará lo más rápido posible para minimizar el estrés y/o las lesiones, retirando la red de niebla para que no quede atrapado nuevamente.

9. Requisitos especiales para el mantenimiento de animales: No Sí

No se retendrán en absoluto, sino que se liberarán inmediatamente después de su procesamiento en el campo, es decir luego de la toma de muestra orofaríngea.

a. En caso de requerir enjaulamiento especifique el medio:

tipo: bolsa térmica; tamaño: individual; material: tela/alambre

10. Marque todas las casillas correspondientes. Si hay más de una casilla marcada por encabezado, numere para que se cumpla.

Instrucciones para animales enfermos

Instrucciones para control de plagas de animales muertos

Investigador de llamadas

Investigador de llamadas

Ninguno

Necropsia

Clínico para tratar

Tira de plagas

Terminar la captura

Anotar observaciones

Recolectar

Llevar al museo de la UTPL

11. PERÍODO PROPUESTO: 01 agosto del 2022 a 23 de marzo del 2023

¿La información confidencial está contenida en el proyecto? Sí No

12. OBTENCIÓN Y CUIDADO DE ANIMALES (Adjunte hojas adicionales si es necesario)

Los animales fueron manejados de conformidad con las regulaciones para el cuidado y uso de animales en investigación en el "Código Orgánico del Ambiente" (ROS No 983, Ecuador).

Los procedimientos del manejo de animales silvestres se basaron en la normativa vigente de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) donde los operativos de control de vectores se basan en el Manual para la Prevención y Control de Rabia Bovina en el Ecuador, codificada en la Ley Orgánica de la Sanidad Agropecuaria, mediante Resolución DAJ-2013461-0201.0214, la cual fue publicada en el Registro Oficial N°211 el 25 de marzo de 2014, ningún animal fue sacrificado.

Para la captura y toma de muestras también se aplicó la normativa vigente de la Universidad Técnica Particular de Loja basadas en el Estudio y Manejo de mamíferos silvestres del Ecuador descrita en la Asociación Ecuatoriana de Mastozoología (AEM) y

aprobada por la Sociedad Americana de Mastozoología publicada en el (2016) y actualizada al año 2022 que cuenta con herramientas oficiales en Ecuador y Latinoamérica.

Especie	Lugar	Por día	Número total
<i>Desmodus rotundus</i>	Zamora	5	37
<i>Anoura geoffroyi</i>	Loja	4	26
<i>Carollia sp</i>	Zamora	3	15
<i>Carollia perspicillata</i>	Zamora	6	35
<i>Enchisthenes arky</i>	Zamora	0	1
<i>Histiotus montanus</i>	Zamora	0	1
<i>Demanura glauca</i>	Zamora	0	1
<i>Carollia brevicaudum</i>	Zamora	0	1
<i>Sturnia giannas</i>	Zamora	2	9
			126

13. PROPÓSITO DEL ESTUDIO (En términos no científicos, describa el propósito general del estudio, la justificación para usar animales, y la relevancia del proyecto para la salud o biología humana/animal. Para cada parte del estudio con animales, describir la especie, sexo, edad y número utilizados. Sé conciso.)

El propósito de este proyecto es evaluar la efectividad del muestreo genético no invasivo para estudiar m murciélagos, especies del bosque seco ecuatoriano. En el bosque seco ecuatoriano, pequeñas colonias que normalmente consisten en una pareja reproductora adulta y crías de años anteriores tienden a posarse en las cavidades de los árboles de Cieba (Navarro & Wilson 1982).

Recolectar una muestra bucal de cada individuo nos permitirá comparar directamente el éxito de la amplificación tanto del ARN. En particular, abordaremos las siguientes preguntas de investigación: 1) ¿El SARS-COV-2 está presente en los murciélagos? 2) ¿Podemos utilizar kits de humanos en murciélagos para detectar SARS-COV-2? Si es así, ¿Es posible amplificar el ARN de las muestras bucales y cuántos veces se pueden repetir el análisis de las muestras para evitar contaminación cruzada?

14. NÚMERO DE ANIMALES Y ÁREA DE ALOJAMIENTO

¿Se ha diseñado el estudio propuesto para minimizar el número de animales utilizados sin dejar de proporcionar resultados científicamente

válidos? **Proporcionar una justificación estadística adecuada.**

Estamos realizando un estudio piloto, diseñado con la intención principal de evaluar la utilidad del ARN de murciélagos como material de plantilla para estudios genéticos no invasivos. Para ser más informativo, un estudio como este debe incluir una comparación entre las tasas de éxito de la amplificación de las muestras orofaríngeas. En este momento, sabemos de sitios de captura como la provincia de Loja y Zamora Chinchipe en el sur del Ecuador (la región geográfica donde se ubicará este estudio).

15. ÁREAS DE ESTUDIO

¿Se llevarán los animales a un laboratorio u otra área y se mantendrán por más de 12 horas?

Sí ___ No X

En caso afirmativo, indique el número de habitación y el edificio.

16. PROCEDIMIENTOS para la toma de muestras orofaríngeas.

Se tomaron muestras de tipo orofaríngeas por cada animal, mediante un hisopo, girando la cabeza de algodón por varias ocasiones dentro del hocico. Las muestras de los hisopos orofaríngeos se colocaron en tubos Falcon de 15ml que contenían 2,5ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (D'MEM) cortando la parte sobresaliente del hisopo para cerrar el criovial y se conservaron a una temperatura de -4°C dentro de un cooler hasta llegar al laboratorio de Biotecnologías de la Universidad Nacional de Loja.

17. Restricción (describir método, duración)

Los murciélagos se capturarán utilizando el procedimiento estándar de redes de niebla (Gannon & Sykes 2007). Las redes se revisarán cada 15 minutos y los murciélagos se retirarán inmediatamente de la red. La especie focal será restringida en una bolsa de tela por no más de 10 minutos adicionales para poder procesar a todos los individuos capturados. Todos liberados brevemente tomando en cuanto el estrés del animal.

18. Si los animales no son sacrificados, indique su destino.

Los murciélagos serán liberados nuevamente en el punto de captura la misma noche en que fueron capturados.

19. ALTERNATIVA AL USO DE ANIMALES VIVOS

La ley federal requiere que el investigador principal CONSIDERE ALTERNATIVAS A LOS PROCEDIMIENTOS QUE PUEDAN CAUSAR MÁS QUE DOLOR MOMENTÁNEO O LEVE O ANGUSTIA A LOS ANIMALES cubiertos por la Ley de Bienestar Animal y la Política del Servicio

de Salud Pública. Para asegurar el cumplimiento de estas normas, la ACUC requiere la siguiente información para todos los protocolos con uso de animales tipo D o E.

Las redes de niebla son el método más eficaz para capturar y manipular murciélagos en el campo (Gannon y Sykes 2007). Hemos considerado enfoques alternativos para obtener ADN de animales capturados (como la recolección de hisopos bucales (saliva) como alternativa a las biopsias de membrana de ala o cola). Sin embargo, *Desmodus rotundus* es un animal vigoroso con poderosas mandíbulas y dentición.

20. Se requiere una narración escrita de los resultados de sus esfuerzos de búsqueda en lo que respecta al estudio. Puede encontrar aclaraciones adicionales sobre lo que califica como información válida para una búsqueda de alternativas cuando no se utiliza una base de datos en la Política 12 del USDA, <http://www.aphis.usda.gov/ac/policy/policy12.pdf>.

Utilizamos una búsqueda en Web of Science el 20 de mayo de 2022 para buscar artículos de los últimos 10 años con palabras clave como "murciélagos neotropicales", "muestra genética", "muestreo genético no invasivo", "recolección fecal de murciélago", "red de niebla". Nuestro estudio recolectaremos una muestra orofaríngea de mamíferos para el uso de mamíferos salvajes en la investigación de la Sociedad Estadounidense de Mammología, creemos que nuestros métodos están completamente de acuerdo con el tratamiento ético de los murciélagos.

21. CUALIFICACIONES DEL PERSONAL Personal involucrado activamente con los componentes animales del proyecto y calificación (como mínimo, debe incluir investigador principal, técnicos de investigación, TA, estudiantes de posgrado, etc.)

Individuo	Componente de proyecto	Calificaciones/ Formación/AAL AS Certificación
Jorge Armijos	Supervisar el proyecto: análisis de laboratorio	Capacitación IACUC completada en 1998
Rodrigo Cisneros	Supervisar proyecto; Observará y asistirá en el campo.	Capacitación IACUC completada
Victor Romero	Técnico de proyectos;	Capacitación IACUC

	Observará y asistirá en el campo.	completada
Gabriela Parra	Alumna: Toma, transporte y análisis de muestras.	Capacitación de IACUC en progreso: se completará antes del inicio del trabajo de campo (finales de agosto)

22. Que el personal involucrado con el proyecto haya asistido a los seminarios sobre uso de animales presentados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales:

Sí No

En caso afirmativo, fecha _____
 Waits completó su capacitación en UI en 1998 y también se desempeñó como miembro del comité de ACUC en el pasado.

GARANTÍA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

La información contenida en este formulario proporciona una descripción precisa del protocolo de cuidado y uso de animales que se seguirá. Acepto cumplir con las regulaciones gubernamentales y las políticas de la universidad con respecto al uso de animales.

Según lo exigen las reglamentaciones federales, las actividades descritas no duplican innecesariamente experimentos anteriores.

 Firma del Investigador Principal Rodrigo Cisneros PhD

 Co-investigador
 Blgo. Mastozoólogo Víctor Romero

 Tutor
 Jorge Armijos PhD

 Alumno
 VZ. Gabriela Parra

- Referencias**
 Gannon, WL y Sikes, RS 2007. Directrices de la Sociedad Estadounidense de Mamíferos Silvestres en la Investigación. Revista de mamalogía, 88(3):809–823.
 Navarro, DI y DEWilson. (mil novecientos ochenta y dos). La Sociedad Americana de Mamalogía, 184.

Anexo 4. Certificado de traducción del Abstract.



CERTIFICADO DE TRADUCCIÓN

Loja 24 de agosto de 2023

Lic.

Nancy Correa Martínez.

CC.EE. Idioma Inglés.

CERTIFICA:

Haber traducido del Idioma Español al Idioma Inglés, el TRABAJO DE TITULACIÓN "DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS DE LA FAMILIA CORONAVIRIDAE EN LOS QUIRÓPTEROS URBANOS DE LAS PROVINCIAS DE LOJA Y ZAMORA CHINCHIPE" elaborado por la Dra. Gabriela Steffania Parra Rivadeneira, portadora de la cédula de identidad No. 1150129680

La técnica de traducción utilizada fue: Traducción Literal.

Lo certifico.

Atentamente



Lic. Nancy Correa Martínez
C.I. 1101706602