



# Detección de Virus Emergentes: Rol del Murciélago Chileno Como Reservorio de Coronavirus

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

Gabriel Alejandro Zamora Zamora

Directores de Memoria: Dr. Aldo Gaggero Brillouet  
Dr. Gonzalo Barriga Pinto

Laboratorio de Virus Ambientales y Laboratorio de Virus Emergentes  
Programa de Virología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante: Dr. Sergio Álvarez Armijo

Laboratorio de Microbiología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Santiago, Chile  
2023

Esta Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Virus Emergentes y el Laboratorio de Virus Ambientales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada por los proyectos Fondecyt inicio N°11200228 (Dr. Gonzalo Barriga) y Fondecyt regular N°1181656 (Dr. Aldo Gaggero).

## **1 Presentaciones en congresos derivadas de esta Memoria de Título.**

- **Gabriel Z Zamora**, Sebastian Aguilar Pierlé, Gonzalo Ossa, Aldo Gaggero, Gonzalo P Barriga. Viroma de *Myotis chiloensis*: Enriquecimiento de alta resolución y ensamblaje del genoma completo de un alfacoronavirus a partir de heces de murciélago. XLIV Congreso Chileno de Microbiología, 29 de Noviembre al 2 de Diciembre, 2022, La Serena, Chile.

## **2 Artículos científicos publicados asociados a esta Memoria de Título**

- Aguilar Pierlé S, **Zamora G**, Ossa G, Gaggero A, Barriga GP. The *Myotis chiloensis* Guano Virome: Viral Nucleic Acid Enrichments for High-Resolution Virome Elucidation and Full Alphacoronavirus Genome Assembly. *Viruses*. 2022 Jan 20;14(2):202. Doi: 10.3390/v14020202.

### 3 Abreviaturas

°C	Grados Celcius
µL	Microlitro
Abs260	Absorbancia a 260 nm
Abs280	Absorbancia a 280 nm
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CoV	Coronavirus
COVID-19	Enfermedad por coronavirus de 2019
E	Proteína de envoltura
EC	Electroconductividad
g	Gramos
h	Horas
H1N1	Influenza A H1N1
HCoV	Coronavirus humano
L	Litros
M	Proteína de membrana
<i>M. chiloensis</i>	<i>Myotis chiloensis</i>
MERS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
mg	Miligramos
min	Minutos
mS	Milisiemens
MTV	Medio de transporte viral

N	Proteína de nucleocápside
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramos
NGS	Secuenciación de nueva generación
nM	Nanomolar
NSP	Proteína no estructural
nt	Nucleótidos
pan-CoV	Pancoronavirus
pb	Pares de bases
PBS	Solucion salina tamponada con fosfato
PEDV	Virus de la diarrea epidémica porcina
RM	Región metropolitana
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
S	Proteína espiga o <i>Spike</i>
s	Segundos
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo
SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2
spp	Especies
Stgo	Santiago
<i>T. brasiliensis</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>
T°	Temperatura
T°a	Temperatura ambiente
TAE	Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA

um	Micrómetros
VI	Región de o'higgins
$\alpha$ -CoV	Alfacoronavirus
$\beta$ -CoV	Betacoronavirus
$\gamma$ -CoV	Gamacoronavirus
$\delta$ -CoV	Deltacoronavirus

## 4 Índice General

1	Presentaciones en congresos derivadas de esta Memoria de Título. ....	iii
2	Artículos científicos publicados asociados a esta Memoria de Título .....	iii
3	Abreviaturas .....	iv
4	Índice General .....	vii
5	Índice de figuras y tablas .....	viii
5.1	Figuras .....	viii
5.2	Tablas .....	viii
6	Resumen .....	ix
7	Abstract .....	xi
8	Introducción .....	1
8.1	Una Salud .....	1
8.1.1	Descripción de zoonosis y visión en Chile .....	3
8.2	Murciélagos como reservorio viral .....	5
8.3	Coronavirus y riesgo zoonótico .....	10
9	Hipótesis.....	12
9.1	Objetivo general .....	12
9.2	Objetivos específicos .....	12
10	Materiales y Métodos.....	13
10.1	Obtención de las muestras.....	13
10.2	Extracción de ARN.....	13
10.3	Detección de CoV .....	13
10.4	Enriquecimiento viral.....	14
10.5	Limpieza, preparación de genotecas y secuenciación.....	15
10.6	Análisis <i>in silico</i> .....	15
10.7	Análisis filogenético.....	18
11	Resultados .....	20
11.1	Obtención de muestras .....	20
11.2	Detección viral .....	21
11.3	Viroma <i>Myotis chiloensis</i> .....	22
11.4	Secuencia $\alpha$ -coronavirus.....	24
11.5	Análisis filogenético.....	26

12	Discusión.....	30
13	Conclusiones.....	34
14	Referencias .....	35

## 5 Índice de figuras y tablas

### 5.1 Figuras

Figura 1.	Esquema de la tríada de Una Salud.....	1
Figura 2.	Relación entre animales salvajes y agentes infecciosos .....	4
<i>Figura 3.</i>	<i>Especies de murciélago en Chile.. ..</i>	<i>9</i>
Figura 4.	Clasificación de HCoV.....	11
Figura 5.	Interfaz del programa CLC Genomics Workbench 20.0.....	16
Figura 6.	Interfaz BLAST.....	16
Figura 7.	Interfaz de búsqueda de ORFfinder .....	17
Figura 8.	Interfaz servidor web Kaiju .....	17
Figura 9.	Interfaz de MEGA 11.....	18
Figura 10.	Interfaz de IQ-TREE.....	19
Figura 11.	Ubicación de los lugares muestreados .....	20
Figura 12.	Muestras agrupadas positivas para pan-CoV .....	22
Figura 13.	Porcentajes de presencia viral en la muestra concentrada.....	24
Figura 14.	Organización genómica teórica .....	25
Figura 15.	Filogenia de la secuencia completa del $\alpha$ -CoV obtenido .....	27
Figura 16.	Filogenia del gen que codifica la proteína S .....	29

### 5.2 Tablas

Tabla 1	Concentraciones de ARN.....	21
---------	-----------------------------	----

## 6 Resumen

### **Detección de virus emergentes: rol del murciélago chileno como reservorio de coronavirus**

Los murciélagos, pertenecientes al orden Chiroptera, son el segundo mamífero más abundante en el planeta, solo superado por los roedores. Desempeñan un papel clave para el funcionamiento de los ecosistemas al participar en procesos fundamentales como lo es la polinización. Su capacidad única entre los mamíferos para volar largas distancias, así como al gran tamaño y longevidad de sus poblaciones, favorecen la persistencia y propagación de agentes infecciosos. Entre estos agentes se encuentran una gran variedad de virus, los cuales han protagonizado eventos zoonóticos importantes causando enfermedades graves tanto en humanos como animales.

A pesar de esto, la comprensión de la diversidad ecológica viral que reside en las poblaciones de murciélagos sigue sin estar clara, lo que complica la determinación de los orígenes de los virus zoonóticos. En Chile, la investigación sobre virus de murciélago se ha enfocado principalmente en el virus de la rabia. Sin embargo, el conocimiento acerca de qué otros virus están presentes en estos murciélagos es un tema en estudio.

Con el fin de ampliar el conocimiento en este tema, se recolectaron muestras de heces de murciélagos insectívoros de amplia distribución geográfica, que comparten su hábitat con los humanos (*Myotis chiloensis*). Mediante la utilización de secuenciación de nueva generación (NGS) después de la detección inicial de coronavirus (CoV) mediante la técnica de RT-PCR, se caracterizó el viroma

presente en el guano. Esto, a su vez, permitió identificar y ensamblar un nuevo alfacoronavirus de *M. chiloensis*, el cual mostró estrecha relación con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), un patógeno viral importante con altas tasas de mortalidad en lechones lactantes.

Este estudio resalta la importancia de llevar a cabo investigaciones sobre la diversidad viral en especies de murciélagos en Chile, mejorando así la vigilancia epidemiológica de patógenos con potencial zoonótico.

## 7 Abstract

### **Detection of emerging viruses: role of the chilean bat as a reservoir of coronaviruses**

Bats, belonging to the order Chiroptera, are the second most abundant mammals on the planet, surpassed only by rodents. They play a crucial role in ecosystem functioning by participating in fundamental processes such as pollination. Their unique ability among mammals to fly long distances, coupled with the large size and longevity of their populations, promotes the persistence and spread of infectious agents. Among these agents are a wide variety of viruses, which have been involved in significant zoonotic events causing serious diseases in both humans and animals.

Despite this, our understanding of the ecological viral diversity residing in bat populations remains unclear, complicating the determination of the origins of zoonotic viruses. In Chile, research on bat viruses has primarily focused on the rabies virus. However, knowledge about the presence of other viruses in these bats is still being studied.

To expand our knowledge in this field, samples of feces were collected from widely distributed insectivorous bats that share their habitat with humans (*Myotis chiloensis*). Through the utilization of next-generation sequencing (NGS) following the initial detection of coronaviruses using the RT-PCR technique, the virome present in the guano was characterized. This, in turn, allowed for the identification and assembly of a novel alphacoronavirus from *M. chiloensis*, which showed a

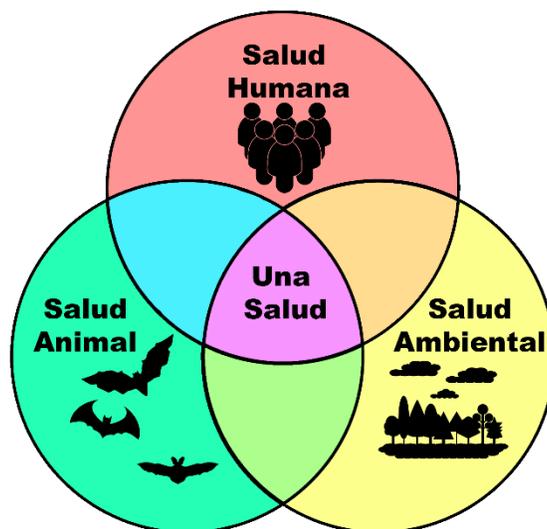
close relationship with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), an important viral pathogen with high mortality rates in suckling piglets.

This study highlights the importance of conducting research on viral diversity in bat species in Chile, thereby improving epidemiological surveillance of pathogens with zoonotic potential.

## 8 Introducción

### 8.1 Una Salud

Una Salud o “*One Health*” es una estrategia mundial que reconoce que la salud humana está relacionada con la salud animal y la salud del medio ambiente (**Figura 1**), bajo el pensamiento de una interconexión e interdependencia entre los organismos vivos y su entorno (Evans & Leighton, 2014). Una Salud es un concepto dinámico que promueve un enfoque multisectorial y transdisciplinario, uno de los cuales se centra en la vigilancia activa de amenazas a la salud pública con especial énfasis en enfermedades infecciosas re-emergentes de origen zoonótico (Capua & Cattoli, 2018). El resultado de esta visión mejora el conocimiento de cómo enfermedades vectoriales y/o zoonóticas, pueden ser compartidas entre los animales y el ser humano con el objetivo de implementar estrategias preventivas y de mitigación (Capua & Cattoli, 2018; Evans & Leighton, 2014; Murphy et al., 2019).



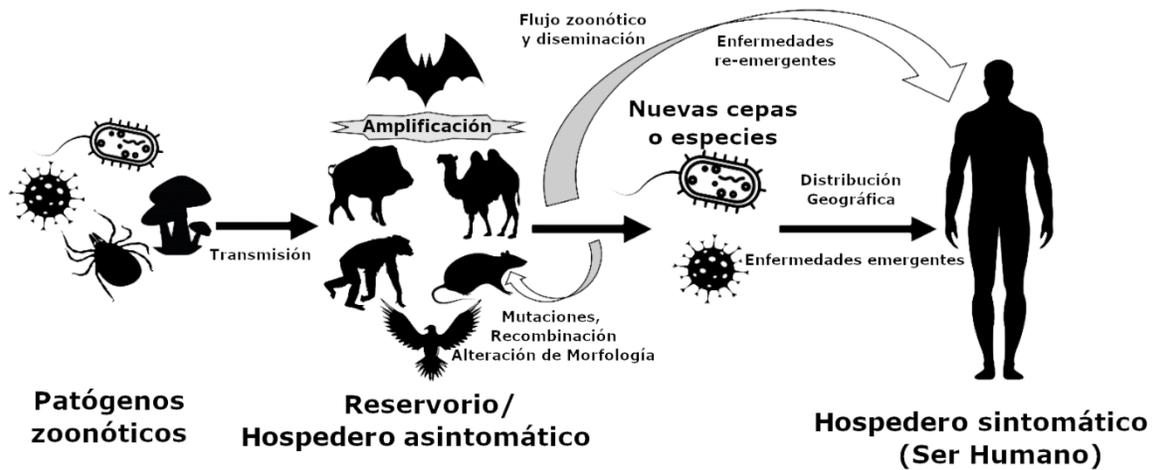
**Figura 1. Esquema de la tríada de Una Salud.** El concepto de “Una Salud” como la interconexión entre el bienestar ambiental, animal y humano.

El concepto de Una Salud, como pensamiento médico integrado fue establecido por el médico y patólogo alemán Rudolf Virchow (1827-1902), quien introdujo el término "zoonosis" y no distinguió una línea divisoria entre la medicina humana y animal, reconociendo que los factores ambientales eran determinantes para la salud (Capua & Cattoli, 2018). William Osler (1849-1919), alumno de Virchow, promovió aún más los conceptos de medicina y biología comparada y la integración de la salud humana y animal, creando el término "Una Medicina" (Dukes, 2000) que fue replanteado por Calvin Schwabet en 1976, incorporando el término "Una Salud", reconociendo plenamente la estrecha interacción sistémica de los seres humanos y los animales para la nutrición, el sustento y la salud (Zinsstag et al., 2011). En la actualidad, la iniciativa Una Salud es reconocida a nivel mundial contando con el compromiso de muchos países e instituciones alrededor del mundo (Humboldt-Dachroeden et al., 2020; Murphy et al., 2019; Overgaauw et al., 2020).

Muchos proyectos de Una Salud se centran en la relación entre los seres humanos y animales domésticos o la salud de la fauna silvestre, debido a que varias pandemias de enfermedades infecciosas y enfermedades zoonóticas re-emergentes se originaron a partir de estas especies animales (Acharya et al., 2020; Humboldt-Dachroeden et al., 2020). Estas amenazas a la salud humana pueden vigilarse y controlarse mejor al aumentar el conocimiento que se tiene respecto a las enfermedades zoonóticas, en especial el monitoreo de éstas entre sus hospederos animales para así planificar estrategias preventivas, con el objetivo de lograr resultados óptimos de salud (Acharya et al., 2020; Murphy et al., 2019).

### 8.1.1 Descripción de zoonosis y visión en Chile

Muchos proyectos de Una Salud se centran en la relación entre humanos y animales domésticos o animales salvajes (**Figura 2**), porque varias de las pandemias de enfermedades zoonóticas y enfermedades infecciosas se han originado a partir de especies animales. Se conoce como zoonosis a cualquier enfermedad o infección que es transmisible naturalmente de animales vertebrados a humanos y que tenga un reservorio animal (Rahman et al., 2020). Aproximadamente un 58% de los patógenos infecciosos en humanos son de origen zoonótico, y alrededor de un 73% de ellos son causados por patógenos de vida silvestre (Jones et al., 2008; Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005). Los virus destacan por su capacidad de cruzar la barrera de especies y afectar a diferentes poblaciones de hospederos, principalmente debido a cambios en los ecosistemas locales y su facilidad de transporte mediante viajes a través de hospederos portadores infectados antes del inicio de los síntomas clínicos (García-Sastre & Richt, 2019). Entre algunos virus de origen zoonótico se encuentran el virus Ébola (Peters & LeDuc, 1999), el virus Influenza A (H1N1) (Lim & Mahmood, 2011), y los coronavirus SARS-CoV (Drosten et al., 2003) y MERS-CoV (Mackay & Arden, 2015), el virus Zika (Musso & Gubler, 2016) y actualmente SARS-CoV-2, causante de la enfermedad COVID-19 (Lai et al., 2020).



**Figura 2. Relación entre animales salvajes y agentes infecciosos.** Los animales salvajes tienen un papel importante en la amplificación y diseminación de agentes infecciosos causantes de enfermedades zoonóticas en humanos. Adaptado de Rahman et al., 2020.

Las causas de la aparición de enfermedades zoonóticas se pueden clasificar en tres categorías: factores ambientales, factores sociodemográficos y factores adaptativos del agente infeccioso. Entre los factores medioambientales destacan las perturbaciones de los ecosistemas naturales, como la deforestación, la expansión agrícola y los incendios, que aumentan la exposición del ser humano a nichos microbiológicos “encapsulados”, lo que facilita la posibilidad de adaptación de los microorganismos a nuevos hospederos (Neiderud, 2015; Tong et al., 2015). Otra de las causas incluye los factores sociodemográficos, como el aumento de la densidad de la población, la baja calidad de vida y la inestabilidad social, que aumentan la probabilidad de que las personas entren en contacto con animales domésticos o salvajes, lo que a su vez facilita las infecciones en humanos (Morse, 1995; Nii-Trebi, 2017; Wolfe et al., 2005). El factor adaptativo del agente patógeno se refiere a la presión selectiva a la que los virus se ven sometidos al ingresar en nuevos hospederos, lo que incluye la necesidad de realizar cambios moleculares

adaptativos para permitir su propagación continua de animal a animal o de humano a humano, evadir el sistema inmunitario del hospedero o desarrollar resistencia a tratamientos antivirales. La adaptación molecular por presión selectiva desempeña un papel importante en la transmisión entre especies ya que implica la generación y propagación de mutaciones beneficiosas que aumentan la aptitud del virus en un entorno específico. Esta selección favorece la acumulación de mutaciones que son beneficiosas para el tropismo viral permitiendo que el virus se adapte a la nueva especie hospedera (Gutierrez et al., 2019). Muchos de los virus emergentes con capacidad de transmisión entre especies tienen genomas de ARN y, como tales, tienen una alta tasa de mutación, lo que facilita la adaptación a nuevas especies (Gutierrez et al., 2019).

## 8.2 Murciélagos como reservorio viral

Entre los distintos hospederos con potencial zoonótico se encuentra el murciélago, vertebrado ampliamente distribuido en el mundo (Teeling et al., 2005), siendo la segunda mayoría de los mamíferos descritos (Burgin et al., 2018), distintos entre sí en anatomía, estilo de vida (Giménez & Giannini, 2017) y funciones en sus nichos ecológicos, entre ellas como controladores de plagas (Boyles et al., 2011) y polinizadores (Maas et al., 2016). Se ha demostrado que los murciélagos (Orden Chiroptera) en comparación con los roedores (Orden Rodentia) albergan una gran cantidad de virus zoonóticos por especie (Luis et al., 2013), incluyendo el virus de la Rabia, Ébola, Nipah, Hendra y Coronavirus (CoV) (Rodhain, 2015), adquiriendo su importancia zoonótica al tener un rol como eslabón de salto entre especies,

afectando a seres humanos, animales domésticos y salvajes (Lau et al., 2005; Liu & Saif, 2020; Mackay & Arden, 2015; Shankar et al., 2005).

Aunque los murciélagos se asocian con muchos de los virus más letales para el ser humano, son conocidos por su vida excepcionalmente larga y por ser menos propensos al cáncer (Wang et al., 2011), por lo tanto, es necesario comprender los mecanismos que impulsan la circulación de los virus en las poblaciones de murciélagos y la resistencia intrínseca hacia ellos. Una hipótesis que explica por qué pueden tener virus con alto potencial patogénico para los seres humanos y no generar enfermedades significativas, es que la temperatura corporal de los murciélagos aumenta producto de la demanda metabólica que se produce durante el vuelo, imitando una respuesta febril que se produce durante una activación inmunitaria (O'Shea et al., 2014). Sin embargo, la capacidad de los filovirus para replicarse eficientemente en un amplio rango de temperaturas (37°C a 41°C) en líneas celulares de murciélago, sugiere que el aumento temporal de la temperatura corporal en los murciélagos durante el vuelo no afectaría significativamente la replicación viral (Miller et al., 2016).

Por lo tanto, es probable que existan otros mecanismos inmunológicos y fisiológicos únicos en los murciélagos, más allá del aumento de temperatura, que permiten esta condición de hospedero de un amplio rango de virus, los que se han adaptado para ser más tolerantes a la respuesta inmune del hospedero y menos virulentos para sus reservorios naturales. Otra hipótesis que podría explicar la aparente resistencia de los murciélagos a enfermedades virales graves, es la presencia de versiones atípicas de los genes relacionados con la respuesta inmune innata y la inflamación. Por ejemplo, en el zorro volador negro (de la

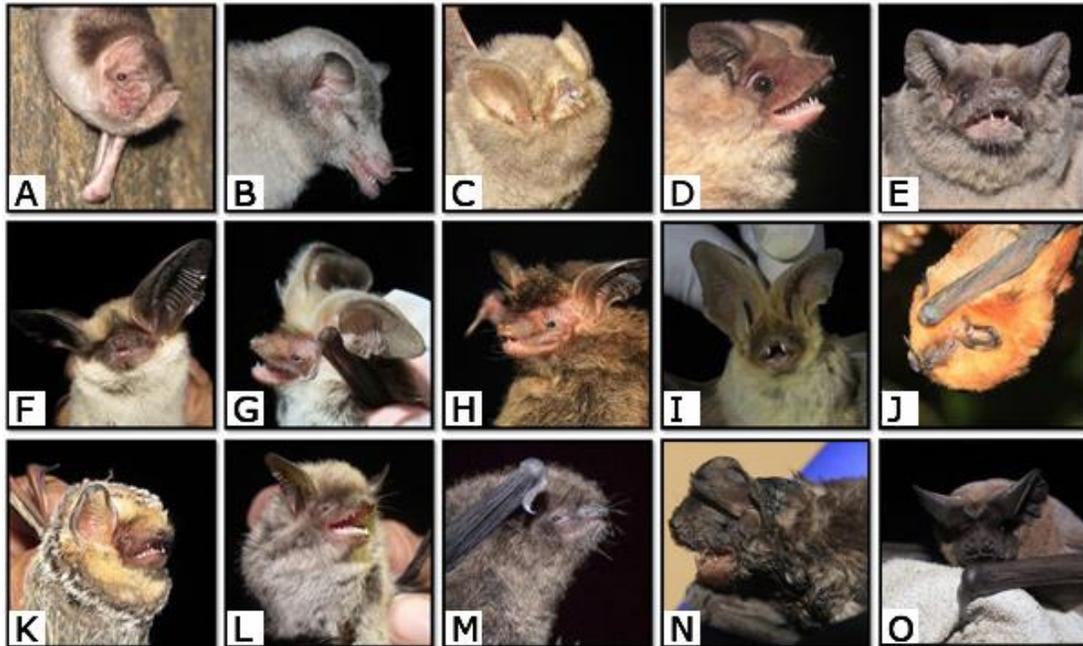
familia Pteropodidae) se tienen versiones únicas de los genes de tipo I interferón, que son cruciales para combatir infecciones virales, existiendo una expresión basal de éstos, mayor en comparación a otros mamíferos, a pesar de que tiene una menor diversidad en sus genes, sugiriendo que el interferón y los genes estimulados por el interferón se expresan constitutivamente en estos murciélagos (Zhou et al., 2016). Por otro lado, un estudio del genoma de los murciélagos egipcios de la fruta (de la familia Pteropodidae) muestra una amplia diversidad de genes de interferón de tipo I, sugiriendo que los tipos de defensa antiviral basados en interferones pueden variar entre especies de murciélagos (Pavlovich et al., 2018). Además, estudios transcriptómicos han revelado diferencias en la expresión de genes pro- y anti-inflamatorios en murciélagos comparados con humanos y ratones (Papenfuss et al., 2012). A su vez, los murciélagos tienen mecanismos que controlan la respuesta inflamatoria, por ejemplo, a través de factores de inhibición que suprimen la expresión de citoquinas proinflamatorias (Banerjee et al., 2017), o a través de mutaciones en moléculas adaptadoras clave en la detección de material genético dañado, reduciendo su funcionalidad (Xie et al., 2018), evitando una sobreexpresión inflamatoria, otorgándole una mayor tolerancia a la patogenia viral (Subudhi et al., 2019). Esto podría permitir una respuesta balanceada para controlar la replicación viral sin provocar una inflamación excesiva dañina. Se necesitan más estudios comparativos de las vías de señalización inmunes entre murciélagos y otras especies para determinar si en estas adaptaciones moleculares subyace su singular resistencia a la patogénesis viral.

Estas características convierten a los murciélagos en uno de los principales reservorios de virus zoonóticos en el mundo (Letko et al., 2020). Debido a esto, es importante monitorear la situación actual en el país, considerando que en la historia ya han ocurrido múltiples saltos de coronavirus entre especies de murciélagos a humanos. Los resultados de este trabajo serán sin duda un recurso muy valioso para dilucidar interacciones específicas entre murciélagos y patógenos en el territorio nacional.

En Chile existen 17 especies de murciélagos distribuidos en todo el territorio, exceptuando la Antártida, pertenecientes al suborden Microchiroptera (Novaes et al., 2022; Ossa et al., 2018; Rodríguez-San Pedro et al., 2016, 2022, 2023). Esta baja diversidad en comparación a otros países

sudamericanos es debido en cierta medida al aislamiento continental dado por la cordillera, el desierto y el océano Pacífico. Actualmente en Chile se encuentran protegidos por la ley N°19473 con el fin de promover su preservación y conservación. La dieta de estas especies de murciélagos en su mayoría es insectívora, exceptuando a *Desmodus rotundus*, único hematófago en el país y *Platalina genovensium* de alimentación nectarívora (Rodríguez-San Pedro et al., 2016). Se ha constatado que algunas especies de murciélagos, como *Tadarida brasiliensis* (*T. brasiliensis*), *Histiotus laeophotis*, *Lasiurus cinereus*, *Myotis atacamensis* y *Myotis chiloensis* (*M. chiloensis*) (**Figura 3**), usan edificaciones humanas para establecer sus colonias. Esto resalta la existencia de un potencial zoonótico entre la interacción de murciélagos y humanos (Rodríguez-San Pedro et al., 2016). En relación con esto último, faltan estudios para complementar la información existente sobre virus en estos especímenes y monitorear la situación

actual en el país. En esta investigación, la mayoría de las muestras analizadas corresponden a *M. chiloensis*, una especie de murciélago común en la zona central del país (Rodríguez-San Pedro et al., 2016) centrando este estudio en su potencial rol como hospedero de virus.



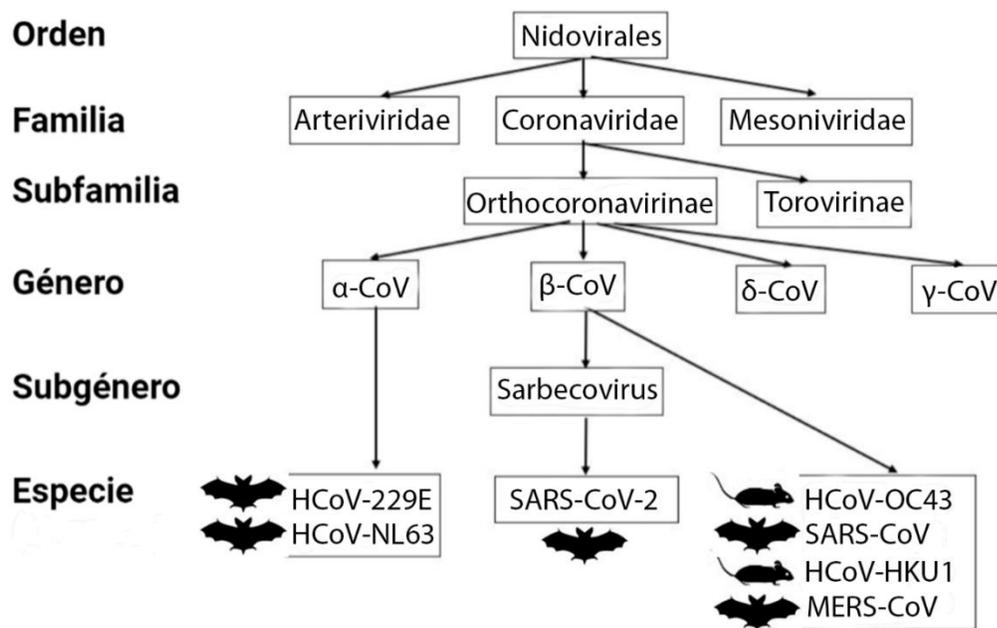
**Figura 3. Especies de murciélago en Chile. A** *Desmodus rotundus*; **B** *Platalina genovensium*; **C** *Amorphochillus schnablii*; **D** *Mormopterus kalinowskii*; **E** *Tadarida brasiliensis*; **F** *Histiotus macrotus*; **G** *Histiotus montanus*; **H** *Histiotus magellanicus*; **I** *Histiotus laephotis*; **J** *Lasiurus varius*; **K** *Lasiurus cinereus*; **L** *Myotis atacamensis*; **M** *Myotis chiloensis*; **N** *Promops davisoni*; **O** *Nyctinomops aurispinosus*; **P** *Myotis aescens*; **Q** *Eumops perotis*. Adaptado de Novaes et al., 2022; Ossa et al., 2018; Rodríguez-San Pedro et al., 2016, 2022, 2023).

### 8.3 Coronavirus y riesgo zoonótico

Los CoV pertenecen a la familia Coronaviridae, orden Nidovirales que a su vez se dividen en 4 géneros, alfacoronavirus ( $\alpha$ -CoV), betacoronavirus ( $\beta$ -CoV), detacoronavirus ( $\delta$ -CoV) y gamacoronavirus ( $\gamma$ -CoV) (**Figura 4**). Poseen un genoma de ARN de cadena simple lineal (~26-32 kb), no segmentado y de polaridad positiva. Su virión tiene 4 proteínas estructurales principales: la proteína de la nucleocápside (N), la proteína de transmembrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína *spike* o espiga (S) (Hasöksüz et al., 2020). Los distintos CoV existentes infectan un variado rango de aves y mamíferos, causando enfermedades respiratorias, entéricas, cardiovasculares y neurológicas (Hasöksüz et al., 2020). La aparición de tres CoV altamente virulentos de origen zoonótico en menos de dos décadas, SARS-CoV (Drosten et al., 2003) en Asia; MERS-CoV (Mackay & Arden, 2015) en Medio Oriente y SARS-CoV-2 (Lai et al., 2020), pandemia en curso originada en China, destaca el potencial de este virus para saltar la barrera entre especies y el papel de los animales en la generación de CoV con alta virulencia que pueden adaptarse a los humanos.

Los CoV tienen una alta capacidad de recombinación genética la cual tiene dos consecuencias evolutivas: por un lado, puede aumentar la tasa adaptativa mediante variaciones genéticas ventajosas, y por otro, pueden estabilizar el ARN genómico mediante la generación de un genoma funcional a través de la eliminación de mutaciones no beneficiosas. Esto tiene como consecuencia una plasticidad genómica que le otorga las características necesarias para saltar de especie (Koma et al., 2020). En la actualidad existen 7 coronavirus humanos (HCoV) (**Figura 4**), de los cuales 5 han sido asociados con murciélagos como su

hospedero natural (Malik, 2020). Los murciélagos han sido identificados como portadores de CoV en África, Asia, Europa y América (Hernández-Aguilar et al., 2021; Huan et al., 2020; Lelli et al., 2013; Pfefferle et al., 2009), hallazgos que sugieren que la asociación de CoV con los murciélagos es un fenómeno mundial, siendo reconocidos como reservorios naturales de CoV de mamíferos y partícipes en la circulación de CoV a otros mamíferos (saltos zoonóticos) (Ye et al., 2020). En vista del potencial zoonótico de este virus, y tomando como referencia que no existe información sobre los coronavirus existentes en nuestro país, es importante **detectar** si están presentes en murciélagos chilenos, como método centinela ante una posible mutación que propicie un nuevo salto de hospedero hacia la especie humana.



**Figura 4. Clasificación de HCoV.** Los HCoV son clasificados en el orden Nidovirales, en la familia Coronaviridae y subfamilia Orthocoronavirinae. A 5 de los HCoV descritos se ha asociado a los murciélagos como su reservorio inicial (representados con un murciélago al lado del HCoV). Los otros 2 HCoV se asocian a roedores como su reservorio inicial. Adaptado de Malik, 2020.

## 9 Hipótesis

La especie *M. chiloensis* presenta coronavirus endémicos.

### 9.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar coronavirus en *M. chiloensis* de la zona central de Chile.

### 9.2 Objetivos específicos

1. Detectar presencia de coronavirus en heces de los murciélagos urbanos.
2. Identificar secuencias virales en muestras positivas de murciélagos urbanos.
3. Establecer una relación filogenética mediante ensayos *in silico* entre coronavirus identificados en murciélagos de Chile y el resto del mundo.

## 10 Materiales y Métodos

### 10.1 Obtención de las muestras

Se obtuvieron muestras de heces de murciélagos de la especie *Myotis chiloensis*, en colonias establecidas en edificaciones humanas entre la Región Metropolitana (RM) y Región de O'Higgins (VI) en las comunas de Codegua (VI) en los años 2018, 2019 y 2021; Palmilla (VI) en el año 2020; Peñaflores (RM) en el año 2020. En adición se analizó una muestra de *Tadarida brasiliensis* obtenida en Santiago Centro (RM) en el año 2021, Chile (**Figura 5A**). Todas las muestras fueron colectadas en tubos de 1,5 mL, para su posterior almacenamiento a -80°C.

### 10.2 Extracción de ARN

Las muestras de heces se agruparon mezclando 60 mg de heces en 1mL de medio de transporte viral (MTV), siendo homogenizadas y posteriormente clarificadas por centrifugación a 7500 x g durante 15 min a 4°C, almacenando el sobrenadante a -80°C. El ARN se extrajo a partir de 250 µL de sobrenadante obtenido, con TRIzol® Reagent (Life Technologies, Estados Unidos) basado en el método de Chomczynski & Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987), según las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se suspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C. La concentración y la pureza se determinaron por absorbancia a 260 y 280 nm usando el lector multi-modal SYNERGY HTX (Agilent Technologies, Estados Unidos).

### 10.3 Detección de CoV

La búsqueda de coronavirus se realizó mediante reacciones de RT-PCR, usando primers para una región conservada en el gen de la ARN polimerasa en los 4

géneros de CoV (pan-coronavirus, pan-CoV). Los partidores usados fueron IZS-CoV FW 5'-CDCAYGARTTYTGYTCNCARC-3' e IZS-CoV RV 5'-RHGGRTANGCRTCWATDGC-3' y amplifican un segmento de 180 pares de bases (pb) (Lelli et al., 2013). La RT-PCR se realizó agregando un volumen de 1 µL de ARN extraído a 20 µL finales por reacción, en un paso de RT-PCR Brilliant III Ultra-Fast (Agilent Technologies, Estados Unidos) y una concentración final de partidores de 200 nM. El programa de la RT-PCR para los partidores IZS-CoV fue una etapa a 50°C x 10 min, una etapa a 95°C x 3 min, 50 ciclos en tres etapas: 95°C x 15 s; 45°C x 30 s; 60°C x 15 s. Por último, se hizo una extensión final durante 10 min a 60°C. El producto de RT-PCR se observó en un gel de agarosa al 2,5 % en TAE 1x. La electroforesis de las muestras se realizó a 80V constante por 30 min.

#### 10.4 Enriquecimiento viral

Para este paso se pesó 5 g de heces de murciélago y se suspendieron en 1 L de PBS 1X estéril. Se homogenizó y centrifugó a 5000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante clarificado se filtró mediante un sistema en serie utilizando filtros de 3; 0,8 y 0,22 µm, para eliminar células eucariotas y procarionas. Al filtrado se le ajustó el pH a 3,5 y la electro-conductividad (EC) a 1,5 mS y se agregó leche descremada al 2% (Difco; #232100) pH 3,5 y EC 1,5 mS (concentración final de la leche 0,02%) y se agitó durante 12 h a temperatura ambiente (T°a). A continuación, se centrifugó la muestra en tubos cónicos de 50 mL a 5000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se juntaron los precipitados, los cuales se resuspendieron en un volumen de *buffer* glicina (0,25 N; pH 9,5) y se

agitó cada 10 min por 40 min, manteniendo en hielo. Luego de agregar un volumen de PBS 2X estéril (pH 7,2), la leche se eliminó por centrifugación a 3000 x g por 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 100000 x g durante 1 h a 4°C. El sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS 1X estéril (pH 7,2) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

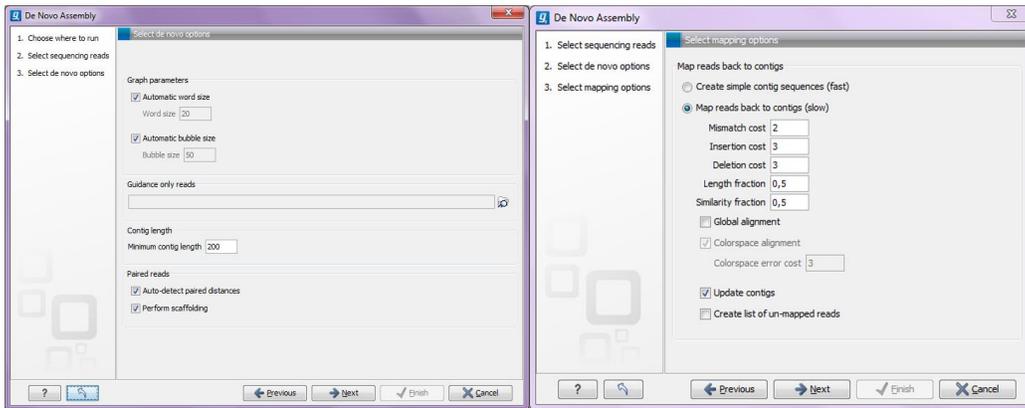
#### 10.5 Limpieza, preparación de genotecas y secuenciación

La preparación de la muestra y la secuenciación se realizó por servicio en Inorevia (Francia). A la muestra purificada y concentrada se le realizó una extracción de ARN usando el sistema comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Estados Unidos). La concentración se midió utilizando el equipo Qubit de Invitrogen. El ARN obtenido luego del enriquecimiento viral, se limpió de ARN ribosomal (ARNr) utilizando el sistema comercial de Illumina *Ribo-Zero gold kit* (Illumina, Estados Unidos) según instrucciones del fabricante. La contaminación por ARNr se determinó en Bioanalyzer 2100 utilizando un nanochip de ARN. La preparación de las genotecas de ARN se hizo a partir de 100ng de ARN, lo que produjo 98,2 nM de material secuenciable de alta calidad, el cual se ejecutó en un cartucho NextSeq 500 Mid Output Kit v2 para secuenciación vía Illumina. Se obtuvo un total de 90.530.942 lecturas brutas.

#### 10.6 Análisis *in silico*

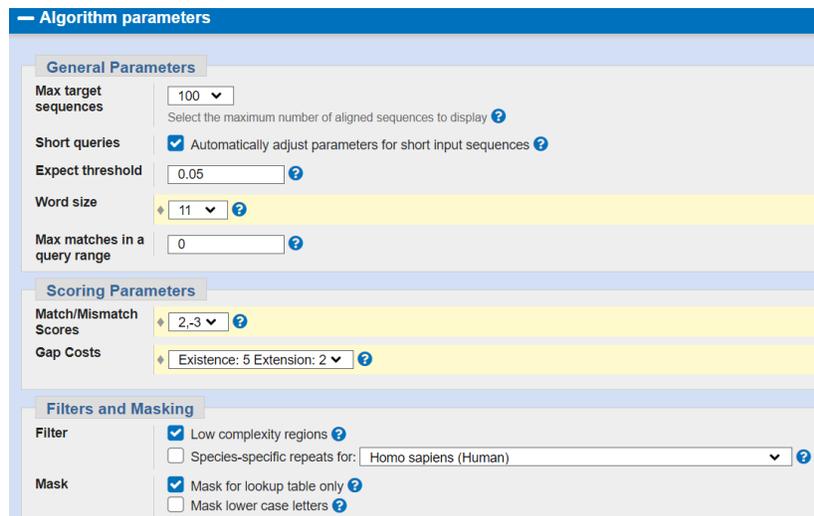
Las lecturas se recortaron y la calidad de éstas se evaluó utilizando la herramienta QC para secuenciación de lecturas del *Genomics Workbench* (QIAGEN, Alemania). El mapeo y el ensamblaje de *novu* también se realizó con este *software*. A continuación, las lecturas se asignaron a tres ensamblajes del genoma

diferentes de *Myotis* spp. para eliminar las secuencias de origen de murciélago. Posteriormente se realizó un ensamblaje de *novo* sobre lecturas de alta calidad bajo los parámetros señalados en la **Figura 5**. Finalmente, las lecturas se mapearon de nuevo a los *contigs* para consolidarlos.



**Figura 5.** Interfaz del programa CLC Genomics Workbench 20.0. El ensamblaje de *novo* se realizó con los parámetros observados en la interfaz del programa.

Los *contigs* ensamblados se sometieron a un *blast* automático con los siguientes parámetros, utilizando la base de datos *blast nr* del NCBI (**Figura 6.**)



**Figura 6.** Interfaz BLAST. Se muestran los parámetros utilizados para el *blast* realizado a los *contigs* obtenidos

La secuencia obtenida se curó manualmente después de determinar los ORF. Para buscar los ORF teóricos de la secuencia obtenida se utilizó la herramienta ORFfinder del NCBI, bajo las condiciones indicadas en la **Figura 7**

Choose Search Parameters

Minimal ORF length (nt): 150

Genetic code: 1. Standard

ORF start codon to use:

"ATG" only

"ATG" and alternative initiation codons

Any sense codon

Ignore nested ORFs:

**Figura 7. Interfaz de búsqueda de ORFfinder.** Parámetros utilizados para la búsqueda del marco de lectura abierto con la herramienta ORFfinder.

Paralelamente, se utilizó el servidor web Kaiju (Menzel et al., 2016) para la clasificación taxonómica bajo los siguientes parámetros presentados en la **Figura 8**.

Options

Reference Database

RefSeq Genomes - proteins from completely assembled RefSeq genomes: Bacteria, Archaea, Viruses

proGenomes - proteins from the representative genomes in proGenomes: Bacteria, Archaea, Viruses.

NCBI BLAST *nr* - non-redundant protein database: Bacteria, Archaea, Viruses

NCBI BLAST *nr* +euk - as above, but also including fungi and microbial eukaryotes.

SEG filter

Filter low complexity protein query sequences

Run mode

MEM - for maximum exact matches.

Greedy - allows mismatches.

Run mode

MEM - for maximum exact matches.

Greedy - allows mismatches.

Minimum match length: 11

Only applicable for Greedy mode:

Minimum match score: 75

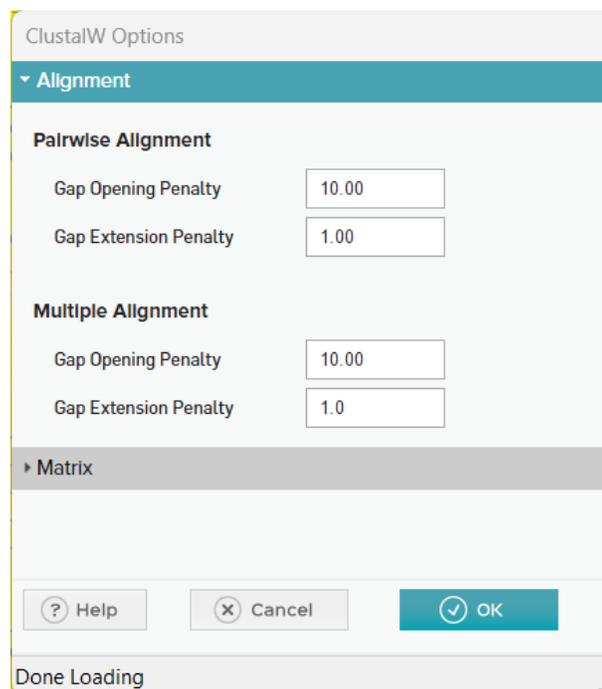
Allowed mismatches: 5

max. E-value: 0.01

**Figura 8. Interfaz servidor web Kaiju.** Los parámetros utilizados para la clasificación taxonómica se anotan en esta imagen. Se utilizaron dos modos distintos (*MEM* y *Greedy*)

## 10.7 Análisis filogenético

Para realizar los análisis filogenéticos, se hicieron los alineamientos utilizando el programa MEGA versión 11 (Tamura et al., 2021). Se alineó la secuencia completa de coronavirus recién ensamblada de *M. chiloensis*, con diversas secuencias virales relacionadas aisladas en diferentes especies, entre ellas: murciélago, murino, felino, porcino, aviar, civeta y humano. Se utilizaron un total de 144 secuencias, incluyendo 92 secuencias completas del genoma y 52 secuencias parciales. El alineamiento se realizó bajo los parámetros mostrados en la **Figura 9**.



**Figura 9. Interfaz de MEGA 11.** Los parámetros utilizados para los alineamientos se realizaron usando el *software* ClustalW recopilado en MEGA 11.

Este alineamiento se utilizó para generar un árbol filogenético utilizando el método *Neighbour Joining* (**Figura 10**), en IQ-TREE (Nguyen et al., 2015).

The image shows the 'Substitution Model Options' and 'Branch Support Analysis' sections of the IQ-TREE software interface. The 'Substitution Model Options' section includes a dropdown for 'Substitution model' set to 'Auto', a checked checkbox for 'FreeRate heterogeneity: Yes [+R]', and several other options for rate heterogeneity and state frequency. The 'Branch Support Analysis' section includes radio buttons for 'Bootstrap analysis' (Ultrafast is selected), a dropdown for 'Number of bootstrap alignments' set to 1000, and other settings for file creation, iterations, correlation coefficient, and branch tests.

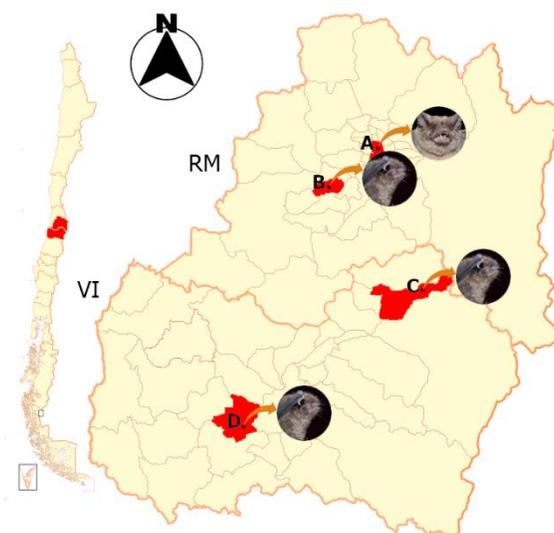
Section	Parameter	Value
Substitution Model Options	Substitution model	Auto
	FreeRate heterogeneity	Yes [+R]
	Rate heterogeneity	Gamma [+G], Invar. sites [+I]
	#rate categories	4
	State frequency	Empirical (from data), AA model (from matrix), ML-optimized, Codon F1x4, Codon F3x4
	Ascertainment bias correction	Yes [+ASC]
	Branch Support Analysis	Bootstrap analysis
Number of bootstrap alignments		1000
Create .ufboot file		Yes (write bootstrap trees to .ufboot file)
Maximum iterations		1000
Minimum correlation coefficient		0.99
Single branch tests		SH-aLRT branch test: Yes, #replicates: 1000
Approximate Bayes test		Yes

**Figura 10. Interfaz de IQ-TREE.** El modelo de sustitución usado fue automáticamente detectado por el servidor. El *bootstrap* usado fue de 1000.

## 11 Resultados

### 11.1 Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron de asentamientos humanos en comunas de dos regiones de Chile. De la Región Metropolitana (RM) se muestreó el centro de una metrópolis (Santiago Centro, 404495 habitantes) y una zona semiurbana (Peñaflor, 90201 habitantes). De la Sexta región (VI) se tomaron muestras de un área rural (Palmilla, 12482 habitantes) y una zona que presenta el nido más grande muestreado (Codegua, 12988 habitantes) de la que se hizo seguimiento durante los años 2018, 2019 y 2021 (**Figura 11**). Las muestras de heces fueron tomadas en bolsas de bioseguridad y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 11. Ubicación de los lugares muestreados.** Mapa de la Región Metropolitana (RM) y de la Región de O'Higgins (VI). En rojo se destacan las comunas muestreadas, siendo el sector A la comuna de Santiago Centro ( $33^{\circ}27'44''$  S,  $70^{\circ}39'15,9''$  W); el sector B la comuna de Peñaflor ( $34^{\circ}2'4,1''$  S,  $70^{\circ}34'17,3''$  W); el sector C la comuna de Codegua ( $34^{\circ}2'4,1''$  S,  $70^{\circ}34'17,3''$  W) y el sector D a la comuna de Palmilla ( $34^{\circ}36'27,9''$  S,  $71^{\circ}21'30,3''$  W). La muestra tomada del sector A corresponde a la especie *T. brasiliensis*, mientras que la de los sectores B, C y D a la especie *Myotis chiloensis*. El sector C fue muestreado en los años 2018, 2019 y 2021.

## 11.2 Detección viral

Para la detección viral se decidió agrupar muestras cada ~60 mg de heces obteniéndose una cantidad de muestras (n) (**Tabla 1**) variable según la cantidad de muestra disponible de cada lugar. A estas muestras agrupadas, se les realizó extracción de ARN cuyos rangos de concentración se detallan en la **Tabla 1**.

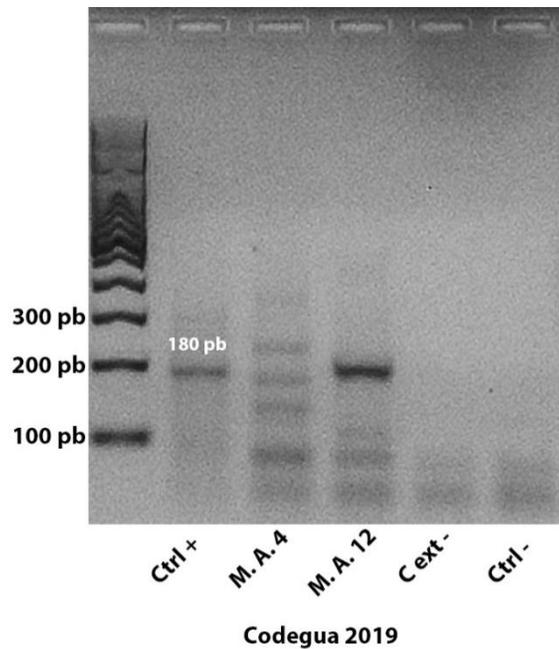
**Tabla 1**

***Concentraciones de ARN***

	Año	n	[ng/ $\mu$ L]	Abs260/Abs280
Codegua	2018	10	92- 675	1,6- 1,8
	2019	24	4- 732	1,2- 1,8
	2021	24	32- 323	1,6- 1,8
Palmilla	2020	10	164- 918	1,7- 1,9
Peñaflor	2020	1	326	1,9
Stgo. Centro	2021	1	479	1,9
Total		70	4-918	1,2- 1,9

Una vez extraído el ARN de las muestras agrupadas, se realizó una reacción de RT-PCR en un solo paso para la búsqueda de material genético viral. Como control positivo se utilizó ARN de SARS-CoV-2. Las muestras analizadas de los sectores A, B y D dieron negativo para la detección de panCoV, mientras que de las pertenecientes al sector C, dos muestras del año 2019 resultaron positivas (**Figura 12**). A partir de estos resultados se concentró y purificó por floculación y

ultracentrifugación los virus de las muestras de ese año, para secuenciar por NGS (Illumina).

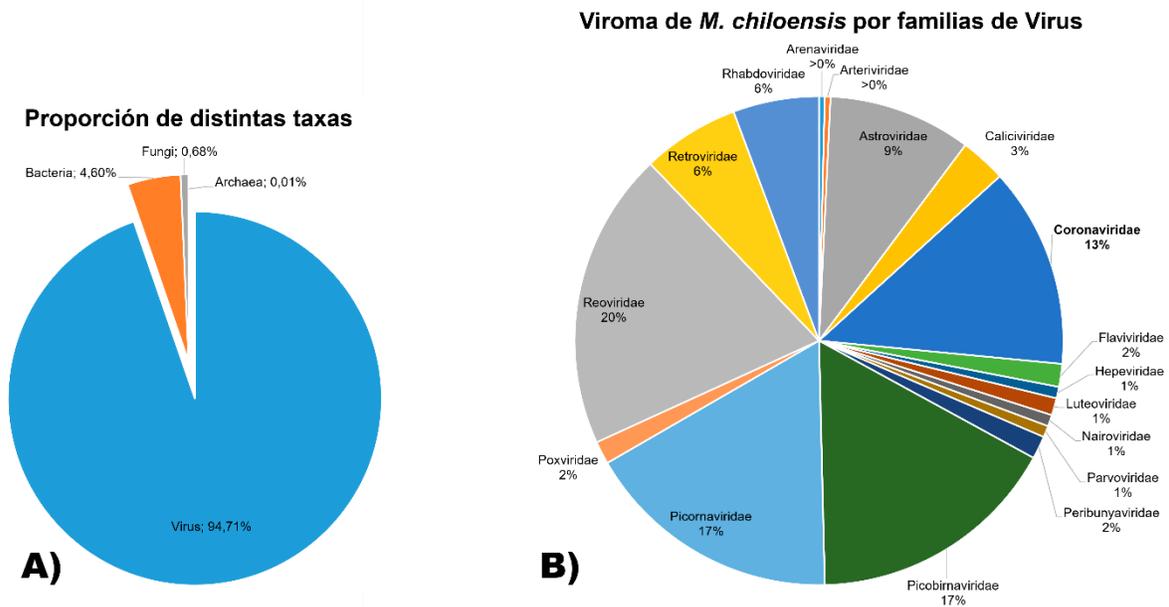


**Figura 12. Muestras agrupadas positivas para pan-CoV.** Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% para el producto de la RT-PCR con partidores IZS-CoV de las muestras agrupadas (M. A.) 4 y 12 de Codegua (sector C) en el año 2019. Ctrl + y Ctrl – hacen referencia a los controles positivo y negativo del RT-PCR y C ext – es el control negativo de la extracción de ARN. Las condiciones de la electroforesis fueron a 80 V durante 40 min en TAE 1X.

### 11.3 Viroma *Myotis chiloensis*

Después de concentrar y enriquecer la muestra, se llevó a cabo la secuenciación utilizando la plataforma Illumina, proporcionada por Inorevia (Francia). En este punto se realizó la extracción de ARN de la muestra y después de un tratamiento para eliminar el ARNr, confirmando la ausencia de ARNr mediante un nanochip de ARN en el equipo Bioanalyzer. Una vez lista la preparación de la genoteca y posterior secuenciación, se obtuvieron un total de 90530942 lecturas brutas de

alta calidad. Las lecturas se filtraron utilizando tres ensamblajes diferentes de *Myotis* spp. antes del ensamblaje de *nov*o de estas lecturas. Esto permitió generar un total de 5597 *contigs* de 200 pb. Paralelamente, se utilizó la herramienta Kaiju (Menzel et al., 2016) para identificar los diferentes taxones presentes en la muestra, lo que reveló un total de 2666 taxones diferentes. El 94,71% de los taxones obtenidos fue de origen viral (**Figura 13 A**), mientras que el 4,6% fue de origen bacteriano y menos del 1% correspondió a hongos y arqueas. Para observar la diversidad viral obtenida a través de las familias virales presentes, se descartaron las secuencias relacionadas con familias virales que por literatura están asociadas a insectos, plantas y hongos, resultando un total de 256 secuencias virales asociadas a 17 familias virales identificadas en un BLAST, arrojando que un 13% de estas secuencias pertenece a la familia Coronaviridae (**Figura 13 B**). También se encontró que el 34% de las secuencias totales pertenece a las familias Picornaviridae y Picobirnaviridae, asociadas a enfermedades gastrointestinales.

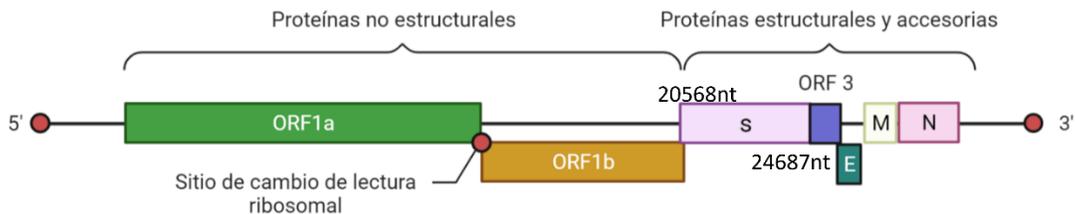


**Figura 13. Porcentajes de presencia viral en la muestra concentrada. A)** Gráfico de clasificación taxonómica para los *contigs* obtenidos. El análisis se realizó con Kaiju (Menzel et al., 2016), identificando que un 94,7% de las taxas son de origen viral. **B)** Diversidad viral representado como porcentajes de familias virales. La representación está hecha en base a los números de lecturas asociadas a cada familia relacionadas con murciélagos, descartando aquellas asociadas a insectos y plantas.

#### 11.4 Secuencia $\alpha$ -coronavirus

Usar la estrategia de ensamblaje de *novo* permitió identificar tres *contigs* con alta cobertura que presentaron una identidad significativa con los coronavirus de los murciélagos. Estos *contigs* se utilizaron para el mapeo y el reensamblaje de una secuencia genómica completa que luego se empleó para los análisis filogenéticos. Por otra parte, la herramienta Kaiju (Menzel et al., 2016) se usó para la clasificación de taxones, identificando un mínimo de 12 *contigs* con identidades significativas con los coronavirus. De ellos, nueve mostraban identidades con  $\alpha$ -

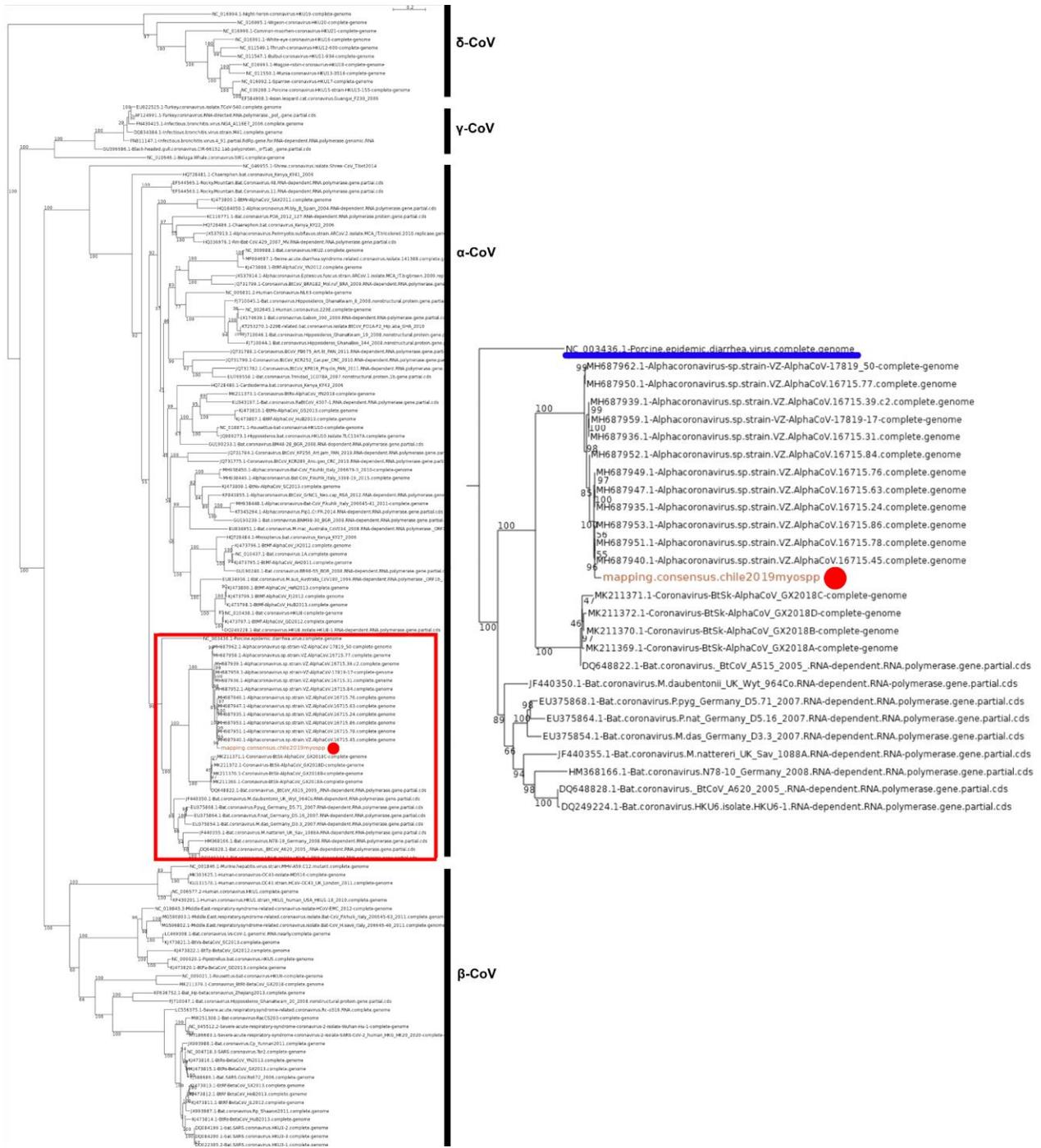
CoV y cinco probablemente eran de origen de murciélago. Se construyeron estos *contigs* a partir mínimo de 200 lecturas. La secuencia completa tenía una longitud de 28312 nt, lo que sugiere que se generó el genoma viral completo. Se utilizó la herramienta de traducción ORFfinder del NCBI, para identificar los marcos de lectura teóricos para cada proteína característica en los CoV (**Figura 14**). Al analizar la secuencia en *Conserved Domain Search*, NCBI, se encontraron los siguientes dominios conservados: *papain-like protease* (PLPro), asociada a NSP3; *3C-like protease* (3CLpro), encontrada en NSP5; *transmembrane domain* (TM), asociada a NSP4; *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp), asociada a NSP12; *zinc binding domain* (ZB) y *helicase domain*, asociados a NSP13; *N-terminal exoribonuclease* (ExoN) y *guanine-N7 methyltransferase* (N7-MTase), asociados a NSP14; *Nidovirus endoribonucleases* (NendoUs), asociado a NSP15, entre otros dominios conservados.



**Figura 14. Organización genómica teórica.** Genoma del  $\alpha$ -CoV secuenciado encontrado en M. chiloensis. Los ORF's teóricos se identificaron por ORFfinder. En los ORF1a y 1b también se encuentran codificadas las proteínas no estructurales NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP7, NSP8, NSP9, NSP12, NSP13, NSP14 y NSP15 (PROSITE, ExPASy). Se identificaron también los genes que codifican para la proteína estructural S (espiga), el cual tiene un largo de 4119 nt y los genes para las proteínas E (envoltura), M (matriz), N (nucleocápside) y la proteína accesoria ORF3.

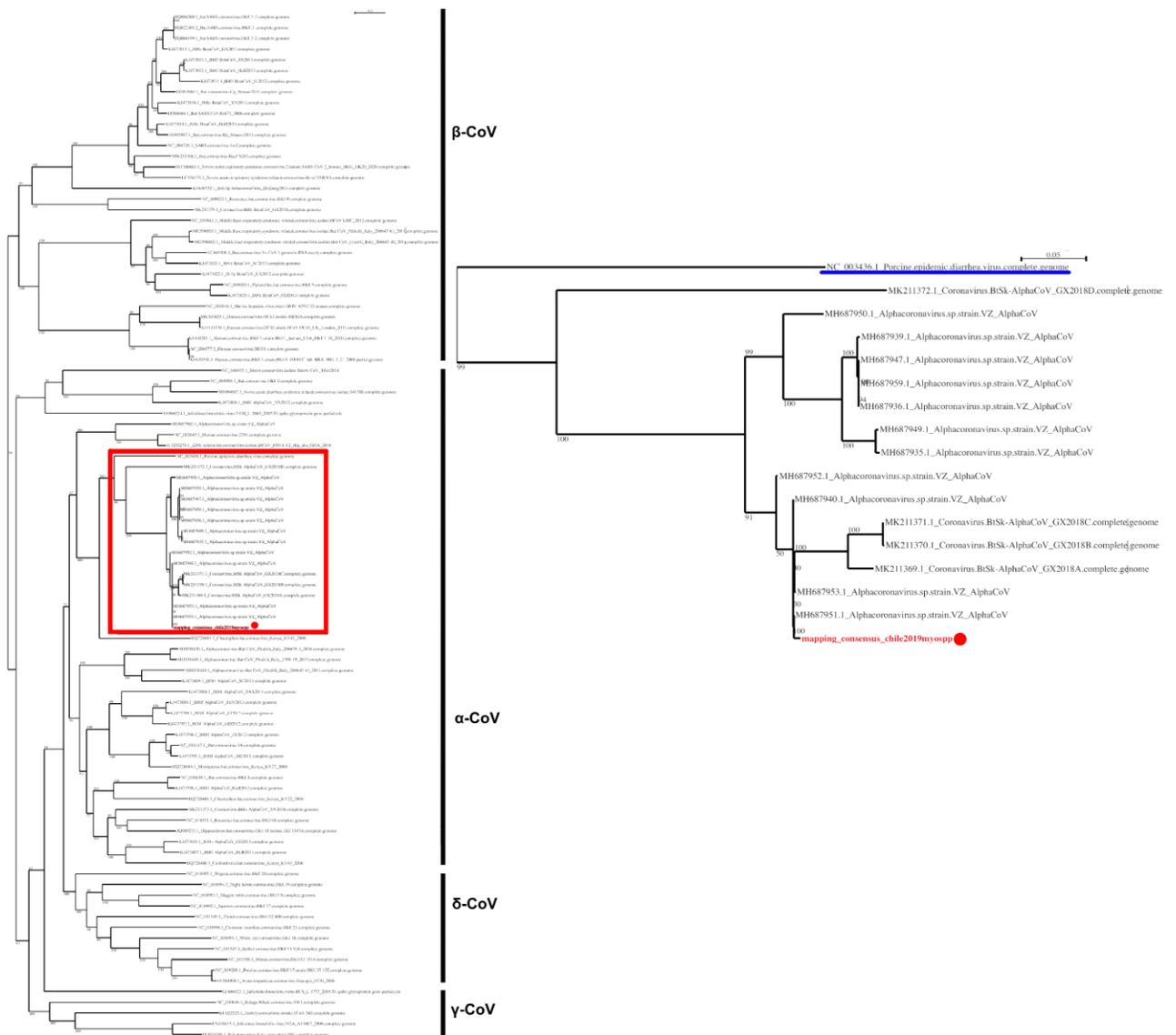
### 11.5 Análisis filogenético

A partir de la secuencia obtenida, se construyó un árbol filogenético usando un total de 135 secuencias de CoV, incluidas 96 secuencias de genoma completo y 39 secuencias parciales. Las secuencias virales usadas se aislaron de diversas especies, como murciélagos, ratones, gatos, cerdos, aves, civetas y seres humanos. Las secuencias se alinearon usando MEGA versión 11 (Tamura et al., 2021) y el árbol filogenético posterior se construyó utilizando IQTREE (Nguyen et al., 2015) comparando las secuencias previas de referencia con el nuevo genoma viral identificado. Como se observa en la **Figura 15**, la secuencia del genoma recién identificada se agrupa con distintos  $\alpha$ -CoV de murciélagos y con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV). La mayoría de los  $\alpha$ -CoV de murciélago que se encontraron en el mismo clado que el identificado en este estudio son procedentes del sudeste asiático y se aislaron a partir de murciélagos insectívoros.



**Figura 15.** Filogenia de la secuencia completa del  $\alpha$ -CoV obtenido. Se representan los distintos géneros de CoV separados en clados:  $\alpha$ -CoV,  $\beta$ -CoV,  $\delta$ -CoV y  $\gamma$ -CoV. En el recuadro se muestra una ampliación parcial del clado  $\alpha$ -CoV, donde se ubica la secuencia obtenida de *M. chiloensis* (punto rojo) agrupándose junto a otras secuencias de  $\alpha$ -CoV. Dentro de este grupo también se encuentra la secuencia de PEDV (subrayada en azul).

También se construyó un árbol filogenético a partir de la secuencia del gen que codifica para la proteína espiga (S) (Figura 16). Este gen se agrupa en un clado con secuencias de  $\alpha$ -CoV de Vietnam, cercanas a la secuencia del PEDV. Para este análisis se utilizaron 94 secuencias completas y 2 parciales del gen que codifica esta proteína.



**Figura 16.** Filogenia del gen que codifica la proteína S. Se representan los distintos clados de CoV separados por género:  $\alpha$ -CoV,  $\beta$ -CoV,  $\delta$ -CoV y  $\gamma$ -CoV. En el recuadro se muestra una ampliación parcial del clado  $\alpha$ -CoV, donde se ubica la secuencia de la proteína S obtenida de *M. chiloensis* (punto rojo) agrupándose junto a otras secuencias de  $\alpha$ -CoV. Dentro de este grupo también se encuentra la secuencia de PEDV (subrayada en azul).

## 12 Discusión

La relación entre murciélagos y coronavirus ha quedado clara a través de los distintos brotes zoonóticos ocurridos en las últimas décadas (Drosten et al., 2003; Lai et al., 2020; Mackay & Arden, 2015), en los cuales se ha determinado que los murciélagos actúan como hospederos de origen u hospederos intermedios en la adaptación y propagación viral (Wang & Anderson, 2019). Esta relación se ha visto fortalecida por los numerosos descubrimientos de coronavirus en murciélagos en el mundo, principalmente en China (Han et al., 2019). En América, hasta el 2020, la positividad para CoV en murciélagos fluctuaba entre el 29,3% y el 0,3% (Hernández-Aguilar et al., 2021) en estudios de 11 países. En este estudio se identificó por primera vez la presencia de un  $\alpha$ -CoV asociado a una especie endémica como lo es *M. chiloensis*, lo cual aporta información valiosa al panorama actual en la relación entre CoV y murciélagos, así como los primeros avances en este tema para Chile. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las muestras recolectadas corresponden a muestras ambientales, las cuales representan a la colonia de murciélagos en su conjunto, lo que dificulta determinar con precisión si las muestras provienen de uno o de varios individuos, lo que imposibilita estimar el porcentaje de prevalencia. En relación con los dos años de muestreo que no dieron resultados positivos en el mismo lugar, es posible que se deba a la dinámica de persistencia o reinfección del virus en la colonia de murciélagos. Es probable que durante los meses que se tomaron muestras, no hubiera infección activa del virus en la población, lo que resultó en una cantidad indetectable de material genético viral en las heces del nido (Letko et al., 2020). Para una mejor evaluación de la presencia de CoV es necesario comprender los

mecanismos que impulsan la circulación de los virus en los murciélagos, incluyendo las condiciones que determinan la presencia de las infecciones en la población. Esto requiere una vigilancia constante para obtener datos a lo largo del tiempo.

A través del análisis del viroma, se investigó la diversidad viral y la presencia y caracterización del CoV encontrado en *M. chiloensis*, en un nido que se encontraba muy próximo a un asentamiento humano (la iglesia de la localidad) (**Figura 5**). El viroma obtenido a partir de las muestras tenía una alta proporción de secuencias virales, incluso en presencia de contaminantes como restos del genoma del hospedero. De estas secuencias, aproximadamente un 13 % correspondía a Coronaviridae, lo que evidencia la estrecha relación entre CoV y murciélagos en el país y sugiere que *M. chiloensis* actúa como hospedero para estos virus. Sin embargo, aún es necesario determinar si esta presencia viral es estable o varía en el tiempo en respuesta al comportamiento dinámico de esta población de murciélagos como lo son los períodos de hibernación, apareamiento o maternidad (Ossa & Pedro, 2015). Además, se obtuvieron familias virales asociadas a insectos (resultados no mostrados), información que permite una caracterización indirecta de la dieta del murciélago, lo que proporciona más información sobre *M. chiloensis*, mejora el conocimiento de su rol en el ecosistema y aclara su función como controlador de plagas en el país.

Como la muestra de Codegua 2019 dio positivo a RT-PCR de pan-CoV, esta familia de virus era de especial interés. El ensamblaje de *de novo* en paralelo con la clasificación taxonómica permitió la identificación de una nueva secuencia de  $\alpha$ -CoV estrechamente relacionada con el PEDV, descrito por primera vez el 2013 en

Estados Unidos, el cual causó una mortalidad del 95% en lechones, entre cuyos síntomas destacan diarrea fétida y vómitos (Stevenson et al., 2013). Esta enfermedad no se encuentra en Chile, lo que implica que no existen cerdos actualmente vacunados contra este virus, representando un peligro para la industria porcina si ocurriera una transmisión entre especies del virus aquí descrito.

Una secuencia similar al PEDV encontrada en *T. brasiliensis* fue descrita en Brasil (Simas et al., 2015), lo que refuerza los resultados de este estudio, aunque en el caso de CoV hay que analizar largos fragmentos de secuencias antes de poder inferir filogenias válidas a partir de la parte conservada del genoma. Existen secuencias de CoV de murciélagos que se encuentran separados geográficamente, que presentan un alto porcentaje de identidad en su genoma, pero que la región del gen que codifica para la proteína *spike* son distintas (Han et al., 2019). Al realizar el análisis filogenético para el gen que codifica la proteína *spike* se encontró que estaba estrechamente relacionado con el PEDV en un clado cercano del árbol filogenético (**Figura 10**) sugiriendo una cercanía evolutiva en el tiempo. El  $\alpha$ -CoV obtenido también está relacionado con secuencias obtenidas en murciélagos de Vietnam con un alto porcentaje de identidad, lo que sugiere un ancestro viral en común. La secuencia no comparte identidad con el coronavirus del síndrome de la diarrea aguda porcina (SADS-CoV), el cual, aunque es genéticamente distinto, es clínicamente similar con el PEDV, causando diarrea y vómitos y una mortalidad superior al 90% en lechones (Gong et al., 2017).

Los  $\alpha$ -CoV humanos 229E y NL63 no evidenciaron una estrecha relación con el genoma del  $\alpha$ -CoV identificado en este estudio. Sin embargo, es importante no

minimizar la relevancia de determinar su potencial zoonótico para los humanos. Recientemente, se demostró que un CoV aislado en murciélagos de Indonesia tiene la capacidad de infectar células humanas (Temmam et al., 2022), lo cual resalta la importancia de mantener la vigilancia epidemiológica y realizar estudios similares en el futuro para este virus. Además, cabe señalar que no se detectaron secuencias asociadas a ningún virus de la rabia o  $\beta$ -CoV, lo que sugiere la ausencia de amenazas zoonóticas asociadas a alta virulencia, en esta población de *M. chilensis* en Codegua. Nuestros datos aportan al conocimiento de los virus presentes en los murciélagos nativos de Chile, destacando la novedad y la necesidad de vigilar las 17 especies, así como probar el potencial zoonótico del virus identificado a través de este estudio.

### 13 Conclusiones

- I. Se detectó la presencia de CoV en heces de la especie *M. chiloensis* y no en *T. brasiliensis*.
  
- II. Se identificó un genoma viral de CoV a partir de las muestras positivas de *M. chiloensis*.
  
- III. Se estableció una relación filogenética mediante ensayos *in silico* entre el genoma viral de CoV identificado en *M. chiloensis* y el resto del mundo.

## 14 Referencias

1. Acharya, K. P., Acharya, N. R., Phuyal, S., Upadhyaya, M., & Lasee, S. (2020). One-health approach: A best possible way to control rabies. *One Health*, *10*, 100161. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100161>
2. Banerjee, A., Rapin, N., Bollinger, T. K., & Misra, V. (2017). Lack of inflammatory gene expression in bats: a unique role for a transcription repressor. *Scientific Reports*, *7*(1), 2232. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01513-w>
3. Boyles, J. G., Cryan, P. M., McCracken, G. F., & Kunz, T. (2011). Economic Importance of Bats in Agriculture. *Science*, *332*(6025), 41-42. <https://doi.org/10.1126/science.1201366>
4. Burgin, C., Colella, J. P., Kahn, P., & Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*, *99*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>
5. Capua, I., & Cattoli, G. (2018). One Health (r)Evolution: Learning from the Past to Build a New Future. *Viruses*, *10*(12), 725. <https://doi.org/10.3390/v10120725>
6. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
7. Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A.M., Berger, A., Burguière, A.-M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.-C., Müller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H.-D., Osterhaus, A.D.M.E., Schmitz, H., Doerr, H.W. (2003). Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, *348*(20), 1967-1976. <https://doi.org/10.1056/nejmoa030747>

8. Evans, B. R., & Leighton, F. A. (2014). A history of One Health. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, 33(2), 413-420. <https://doi.org/10.20506/rst.33.2.2298>
9. García-Sastre, A., & Richt, J. A. (2019). Editorial overview: Emerging viruses: interspecies transmission. *Current Opinion in Virology*, 34, iii-vi. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.02.003>
10. Gong, L., Li, J., Zhou, Q., Xu, Z., Chen, L., Zhang, Y., Xue, C., Wen, Z., & Cao, Y. (2017). A New Bat-HKU2-like Coronavirus in Swine, China, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 1607-1609. <https://doi.org/10.3201/eid2309.170915>
11. Gutierrez, B., Escalera-Zamudio, M., & Pybus, O. G. (2019). Parallel molecular evolution and adaptation in viruses. *Current Opinion in Virology*, 34, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.006>
12. Han, Y., Du, J., Su, H., Zhang, J., Zhu, G., Zhang, S., Wu, Z., & Jin, Q. (2019). Identification of Diverse Bat Alphacoronaviruses and Betacoronaviruses in China Provides New Insights into the Evolution and Origin of Coronavirus-Related Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1900. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01900>
13. Hernández-Aguilar, I., Lorenzo, C., Santos-Moreno, A., Naranjo, E. J., & Navarrete-Gutiérrez, D. (2021). Coronaviruses in Bats: A Review for the Americas. *Viruses*, 13(7), 1226. <https://doi.org/10.3390/v13071226>
14. Huan, C., Pan, H., Fu, S., Xu, W., Gao, Q., Wang, X., Gao, S., Chen, C., & Liu, X. (2020). Characterization and evolution of the coronavirus porcine epidemic diarrhoea virus HLJBY isolated in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 65-79. <https://doi.org/10.1111/tbed.13321>

15. Humboldt-Dachroeden, S., Rubin, O., & Frid-Nielsen, S. S. (2020). The state of One Health research across disciplines and sectors – a bibliometric analysis. *One Health*, 10, 100146. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100146>
16. Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
17. Koma, T., Adachi, S., Doi, N., Adachi, A., & Nomaguchi, M. (2020). Toward Understanding Molecular Bases for Biological Diversification of Human Coronaviruses: Present Status and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02016>
18. Lai, C., Shih, T., Ko, W. C., Tang, H., & Hsueh, P. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(3), 105924. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>
19. Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Li, K. K. W., Huang, Y., Tsoi, H., Wong, B. H., Wong, S. S. Y., Leung, S. Y., Chan, K., & Yuen, K. (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>
20. Lelli, D., Papetti, A., Sabelli, C., Rosti, E., Moreno, A., & Boniotti, M. B. (2013). Detection of Coronaviruses in Bats of Various Species in Italy. *Viruses*, 5(11), 2679-2689. <https://doi.org/10.3390/v5112679>
21. Letko, M., Seifert, S. N., Daszak, P., Plowright, R. K., & Munster, V. J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8), 461-471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>

22. Lim, B. L., & Mahmood, T. (2011). Influenza A H1N1 2009 (Swine Flu) and Pregnancy. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 61(4). <https://doi.org/10.1007/s13224-011-0055-2>
23. Liu, S., & Saif, L. J. (2020). Emerging Viruses without Borders: The Wuhan Coronavirus. *Viruses*, 12(2), 130. <https://doi.org/10.3390/v12020130>
24. Luis, A. D., Hayman, D. T. S., O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C., Mills, J. L., Timonin, M. E., Willis, C. K. R., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Rupprecht, C. E., Wood, J. L. N., & Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756), 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
25. Maas, B., Karp, D. D., Bumrungsri, S., Darras, K., Gonthier, D. J., Huang, J., Lindell, C. A., Maine, J. J., Mestre, L., Michel, N. L., Morrison, E., Perfecto, I., Philpott, S. M., Şekercioğlu, Ç. H., Silva, R. B., Taylor, P. J., Tscharntke, T., Van Bael, S. A., Whelan, C. T., & Williams-Guillén, K. (2016). Bird and bat predation services in tropical forests and agroforestry landscapes. *Biological Reviews*, 91(4), 1081-1101. <https://doi.org/10.1111/brv.12211>
26. Mackay, I. R., & Arden, K. E. (2015). MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, 12(1), 222. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0439-5>
27. Malik, Y. A. (2020). Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*, 42(1), 3-11.
28. Menzel, P., Ng, K. C., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7(1), 11257. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>

29. Miller, M. E., McMinn, R., Misra, V., Schountz, T., Müller, M. A., Kurth, A., & Munster, V. J. (2016). Broad and Temperature Independent Replication Potential of Filoviruses on Cells Derived from Old and New World Bat Species. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(suppl 3), S297-S302. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw199>
30. Morse, S. (1995). Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1(1), 7-15. <https://doi.org/10.3201/eid0101.950102>
31. Murphy, S.C., Negron, M.E., Pieracci, E.G., Deressa, A., Bekele, W., Regassa, F., Wassie, B.A., Afera, B., Hajito, K.W., Walelign, E., Abebe, G., Newman, S., Rwego, I.B., Mutonga, D., Gulima, D., Kebede, N., Smith, W.A., Kramer, L.M., Kibria, A., Bonnenfant, Y.T., Mortenson, J.A., Vieira, A.R., Kadzik, M., Sugerman, D., Amare, B., Kanter, T., Walke, H., Belay, E., Gallagher, K. (2019). One Health collaborations for zoonotic disease control in Ethiopia. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, 38(1), 51-60. <https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2940>
32. Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487-524. <https://doi.org/10.1128/cmr.00072-15>
33. Neiderud, C. (2015). How urbanization affects the epidemiology of emerging infectious diseases. *Infection ecology & epidemiology*, 5(1), 27060. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.27060>
34. Nguyen, L. H., Schmidt, H., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
35. Nii-Trebi, N. I. (2017). Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. *BioMed Research International*, 2017, 5245021. <https://doi.org/10.1155/2017/5245021>

36. Novaes, R. L. M., Pedro, A. R., Saldarriaga-Córdoba, M., Aguilera-Acuña, O., Wilson, D. E., & Moratelli, R. (2022). Systematic review of *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from Chile based on molecular, morphological, and bioacoustic data. *Zootaxa*, 5188(5), 430-452. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5188.5.2>
37. O'Shea, T. M., Cryan, P. M., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Hayman, D. T. S., Luis, A. D., Peel, A. J., Plowright, R. K., & Wood, J. L. N. (2014). Bat Flight and Zoonotic Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 741-745. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>
38. Ossa, G., Lilley, T. M., Ugarte-Núñez, J., Ruokolainen, L., Vilches, K., Valladares-Faúndez, P., & Yung, V. (2018). First record of *Promops davisoni* (Thomas, 1921) (Chiroptera, Molossidae) from Chile and a description of its echolocation calls. *Mastozoología neotropical*, 25(1), 129-137. <https://doi.org/10.31687/saremmn.18.25.1.0.12>
39. Ossa, G., & Pedro, A. R. (2015). *Myotis chiloensis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Mammalian Species*, 47(922), 51-56. <https://doi.org/10.1093/mspecies/sev005>
40. Overgaaauw, P., Vinke, C. M., Van Hagen, M. A. E., & Lipman, L. J. (2020). A One Health Perspective on the Human–Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3789. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113789>
41. Pavlovich, S. S., Lovett, S., Koroleva, G. I., Guito, J. C., Arnold, C., Nagle, E. R., Kulcsar, K., Lee, A., Thibaud-Nissen, F., Hume, A. J., Mühlberger, E., Uebelhoer, L. S., Towner, J. S., Rabadan, R., Sanchez-Lockhart, M., Kepler, T. B., & Palacios, G. (2018). The Egyptian Rousette Genome Reveals Unexpected Features of Bat Antiviral Immunity. *Cell*, 173(5), 1098-1110.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.070>

42. Peters, C., & LeDuc, J. W. (1999). An Introduction to Ebola: The Virus and the Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(s1), ix-xvi. <https://doi.org/10.1086/514322>
43. Pfefferle, S., Opong, S. A., Drexler, J. F., Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Müller, M. A., Annan, A., Vallo, P., Adu-Sarkodie, Y., Kruppa, T., & Drosten, C. (2009). Distant Relatives of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Close Relatives of Human Coronavirus 229E in Bats, Ghana. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1377-1384. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090224>
44. Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, S., Levy, S., Hossain, M. J., Zowalaty, M. E. E., Rahman, A. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
45. Rodhain, F. (2015). Chauves-souris et virus: des relations complexes. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique*, 108(4), 272-289. <https://doi.org/10.1007/s13149-015-0448-z>
46. Rodríguez-San Pedro, A., Allendes, J. L., & Ossa, G. (2016). Lista actualizada de los murciélagos de Chile con comentarios sobre taxonomía, ecología, y distribución. *Biodiversity and Natural History*, 2(1), 16-39.
47. Rodríguez-San Pedro, A. R., Pacheco, J. A., Beltrán, C., Allendes, J. L., & Ugarte-Núñez, J. A. (2023). *Eumops perotis* (Schinz, 1821) (Chiroptera, Molossidae): a new genus and species for Chile revealed by acoustic surveys. *Mammalia*, 87(3), 283-287. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2022-0136>
48. Rodríguez-San Pedro, A. R., Ugarte-Núñez, J., Beltrán, C. A., & Allendes, J. L. (2022). First record of the Peale's free-tailed bat *Nyctinomops aurispinosus* (Peale, 1848) (Chiroptera, Molossidae) from Chile revealed by acoustic surveys, with notes

- on ecology and distribution. *Mammalia*, 86(4), 321-327.  
<https://doi.org/10.1515/mammalia-2021-0123>
49. Shankar, V., Orciari, L. A., De Mattos, C. C., Kuzmin, I. V., Pape, W. J., O'Shea, T. J., & Rupprecht, C. E. (2005). Genetic Divergence of Rabies Viruses from Bat Species of Colorado, USA. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 5(4), 330-341.  
<https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.330>
50. Simas, P. V. M., De Souza Barnabé, A. C., Durães-Carvalho, R., De Lima Neto, D. F., Caserta, L. C., Artacho, L., Jacomassa, F. A. F., Martini, M. C., Santos, M. V. D., Felipe, P. A. N., Ferreira, H. L., & Arns, C. W. (2015). Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), 729-731.  
<https://doi.org/10.3201/eid2104.141783>
51. Stevenson, G. W., Hoang, H., Schwartz, K., Burrough, E. R., Sun, D., Madson, D. M., Cooper, V. L., Pillatzki, A., Gauger, P. C., Schmitt, B. J., Koster, L., Killian, M. L., & Yoon, K. (2013). Emergence of *Porcine epidemic diarrhea virus* in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(5), 649-654.  
<https://doi.org/10.1177/1040638713501675>
52. Subudhi, S., Rapin, N., & Misra, V. (2019). Immune System Modulation and Viral Persistence in Bats: Understanding Viral Spillover. *Viruses*, 11(2), 192.  
<https://doi.org/10.3390/v11020192>
53. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
54. Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P. D., O'Brien, S. J., & Murphy, W. J. (2005). A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the

- Fossil Record. *Science*, 307(5709), 580-584.  
<https://doi.org/10.1126/science.1105113>
55. Temmam, S., Vongphayloth, K., Baquero, E., Munier, S., Bonomi, M., Regnault, B., Douangboubpha, B., Karami, Y., Chrétien, D., Sanamxay, D., Xayaphet, V., Paphaphanh, P., Lacoste, V., Somlor, S., Lakeomany, K., Phommavanh, N., Pérot, P., Dehan, O., Amara, F., Donati, F., Bigot, T., Nilges, M., Rey, F.A., van der Werf, S., Brey, P.T., Eloit, M. (2022). Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature*, 604(7905), 330-336.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4>
56. Tong, M. C. F., Hansen, A., Hanson-Easey, S., Cameron, S. J., Xiang, J., Liu, Q., Sun, Y., Weinstein, P., Han, G., Williams, C. M., & Bi, P. (2015). Infectious Diseases, Urbanization and Climate Change: Challenges in Future China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 11025-11036. <https://doi.org/10.3390/ijerph120911025>
57. Wang, L., & Anderson, D. E. (2019). Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Current Opinion in Virology*, 34, 79-89.  
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.007>
58. Wang, L., Walker, P. J., & Poon, L. L. (2011). Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? *Current Opinion in Virology*, 1(6), 649-657.  
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>
59. Wolfe, N. D., Daszak, P., Kilpatrick, A. M., & Burke, D. S. (2005). Bushmeat Hunting, Deforestation, and Prediction of Zoonotic Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1822-1827. <https://doi.org/10.3201/eid1112.040789>

60. Woolhouse, M. E. J., & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1842-1847. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050997>
61. Xie, J., Li, Y., Shen, X., Goh, G., Zhu, Y., Cui, J., Wang, L., Shi, Z., & Zhou, P. (2018). Dampened STING-Dependent Interferon Activation in Bats. *Cell Host & Microbe*, 23(3), 297-301.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.006>
62. Ye, Z., Yuan, S., Yuen, K., Fung, S., Chan, C., & Jin, D. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1686-1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
63. Zhou, P., Tachedjian, M., Wynne, J. H., Boyd, V., Cui, J., Smith, I., Cowled, C., Ng, J. H. J., Mok, L., Michalski, W. P., Mendenhall, I. H., Porter, C. J., Wang, L., & Baker, M. L. (2016). Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of *IFN- $\alpha$*  in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(10), 2696-2701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518240113>
64. Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., & Tanner, M. (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3-4), 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>