



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CIRCULACIÓN DE ALFA Y BETA CORONAVIRUS EN
MURCIÉLAGOS DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS 2020-
2021.**

TESIS DE GRADO

**Trabajo de titulación presentado como requisito para la
obtención del título de**

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

AUTOR

VALENCIA VENTURA PAMELA ALEXANDRA

TUTOR

Dr. Msc Solon Alberto Orlando Narváez

GUAYAQUIL-ECUADOR

2022



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

APROBACIÓN DEL TUTOR

Yo, SOLÓN ALBERTO ORLANDO NARVAEZ, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: CIRCULACIÓN DE ALFA Y BETA CORONAVIRUS EN MURCIÉLAGOS DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS 2020-2021, realizado por la estudiante VALENCIA VENTURA PAMELA ALEXANDRA; con cédula de identidad N°0931434291 de la carrera MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, Unidad Académica Guayaquil, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

Firma del Tutor

Guayaquil 03 de marzo del 2022



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: “DETECCIÓN DE ALFA Y BETA CORONAVIRUS EN MURCIÉLAGOS DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS 2020-2021”, realizado por la estudiante VALENCIA VENTURA PAMELA ALEXANDRA, la mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

PIÑA PAUCAR ANA MVZ MSc

PRESIDENTE

CARILLO CEDEÑO CESAR MVZ MSc.

EXAMINADOR PRINCIPAL

FLOR ALVAREZ SILVIA MVZ MSc

EXAMINADOR PRINCIPAL

ORLANDO NARVAEZ SOLON MVZ MSc

EXAMINADOR SUPLENTE

Guayaquil, 7 de abril del 2022

Dedicatoria

En memoria de mi padre Marco Antonio Valencia Parra, por su acompañamiento incondicional a lo largo de mi carrera y en mi vida diaria, espero llenarte de orgullo siempre.

A mi madre y hermanos por siempre motivarme en mi desarrollo personal y cuidarme día a día.

Al Dr. Solón Alberto, sin sus conocimientos e iniciativa nada de esto sería posible.

Agradecimiento

Quiero agradecer al Dr. Alberto Orlando, Dr. Arcos, Dra. Joselyn Calderón, Dra. Ariana León, por todo su apoyo en la ejecución de investigación.

Gracias a mi madre, hermanos, amigos por la motivación en este trabajo de titulación y en mi vida diaria.

Autorización de Autoría Intelectual.

Yo PAMELA ALEXANDRA VALENCIA VENTURA en calidad de autor(a) del proyecto realizado, sobre “DETECCIÓN DE ALFA Y BETA CORONAVIRUS EN MURCIÉLAGOS DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS 2020-2021” para optar el título de MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor(a) me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil 23 de febrero de 2022.

VALENCIA VENTURA PAMELA ALEXANDRA

C.I. 0931434294

Índice General.

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	2
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓ.....	3
Dedicatoria	4
Autorización de Autoría Intelectual.....	6
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras	11
Resumen	12
1. Introducción.....	13
1.1 Antecedentes del problema.....	14
1.2 Planteamiento y formulación del problema.....	16
1.2.1 Planteamiento del problema.....	16
1.2.2 Formulación del problema.....	16
1.3 Justificación del problema.....	17
1.4 Delimitación de la investigación.....	18
1.5 Objetivo general.....	18
1.6 Objetivo específico.....	18
1.7 Hipótesis.....	18
2.2.1 Murciélagos.	20
2.2.3 Estructura de coronavirus.....	21
2.2.4 Acción patógena general.....	22

2.2.5 Alfa y beta coronavirus en otras especies.....	23
2.2.6 Alfa coronavirus.	23
2.2.7 Beta coronavirus.	25
2.2.8 SARS CoV.	25
2.2.9 MERS CoV.	26
2.2.10 SARS CoV 2.....	26
2.2.11 Fisiopatología de Beta coronavirus zoonóticos MERS CoV, SARS CoV, SARS cov 2.	27
2.2.12 Técnica de Diagnóstico.....	27
2.2.13 PCR.	27
2.2.14 Detección serológica, anticuerpos.	28
2.2.15 Otras pruebas de diagnóstico.	28
2.2.16 Prevención	29
2.3 Marco legal	29
3. Materiales y Métodos.....	30
3.1 Enfoque de la investigación	30
3.1.1 Tipo de investigación	30
3.1.2 Lugar de Estudio.	30
3.1.3 Diseño de investigación.....	30
3.2. Metodología.	31
3.2.1 Variable.....	31

3.2.1.1 Variable dependiente.	31
3.2.1.2 Variable independiente	31
3.2.2 Universo y tamaño de la muestra.	35
3.2.3 Recolección de datos.	35
3.2.4 Tratamientos	35
3.2.5 Recursos.	35
3.2.6 Métodos y técnicas.	36
3.2.7 Análisis estadístico	38
4.3. Determinación de la presencia de alfa y beta coronavirus (Pancoronavirus) en murciélagos de la provincia del Guayas.	42
4.2 Determinación de Especie, género y características del entorno ecológico de murciélagos positivos a Pancoronavirus.	42
Tabla 8 Determinación de especie y género de los murciélagos positivos a Pancoronavirus capturados, zona y su característica.	42
7. Recomendaciones	48
8. Bibliografía	49
9.1 Gráficos	57
Anexos 9.2 fotografía de trabajo de campo y laboratorio.	60

Índice de tablas

Tabla 1 variable dependiente.....	31
Tabla 2 variable independiente.....	31
Tabla 3 Frecuencia de género y especie de murciélagos capturados en la provincia del Guayas.....	39
Tabla 4 Caracterización de las distintas especies de murciélagos capturados y su entorno ecológico.	40
Tabla 5 Frecuencia absoluta y relativa de murciélagos capturados características de temperatura y humedad de las zonas establecidas.	41
Tabla 6 Frecuencia de alfa y beta coronavirus en murciélagos de la provincia del Guayas.....	42
Tabla 7 Determinación de especie y género de los murciélagos positivos a Pancoronavirus capturados, zona y su característica.	42

Índice de figuras

Ilustración 1 Frecuencia absoluta de especies de murciélagos capturados en las zonas establecidas de la provincia del Guayas.	57
Ilustración 2 Frecuencia absoluta de género de murciélagos capturados en las zonas establecidas de la provincia del Guayas.	57
Ilustración 3 frecuencia absoluta de captura de murciélagos en las zonas previamente establecidas en conjunto a su temperatura y humedad.	58
Ilustración 4 Determinación características del entorno ecológico de murciélagos positivos a Pancoronavirus.	58
Ilustración 5 Pan coronavirus frecuencia absoluta.	59
Ilustración 6 Pan coronavirus frecuencia relativa.	59
Ilustración 7 Identificación de lugar y colocación de redes de niebla.	60
Ilustración 8 captura de murciélagos.....	60
Ilustración 9 Ejemplar de <i>Carollia perspicillata</i>.....	60
Ilustración 10 Ejemplar de <i>Desmodus rotundus</i>	61
Ilustración 11 Extracción de ARN para pruebas particulares.....	61
Ilustración 12 Amplificación de RdRp (440 bp), se realizó la prueba a través de la amplificación de la secuencia de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp) por PCR anidada punto final.....	61

Resumen

En la actualidad existen varios brotes importantes de enfermedades de transmisión zoonótica que involucran a los murciélagos, estos pertenecen al grupo de mamíferos ampliamente distribuidos a nivel mundial, en Ecuador existen aproximadamente 173 especies, pero no se descarta descubrir más con el pasar de los años, de allí partimos con la gran necesidad de conocer más sobre estos mamíferos, en este estudio mediante la captura de murciélagos empleando redes de nieblas y manteniendo el bienestar animal. Se obtuvo una diversidad del 12% del total de especies de Ecuador en 10 zonas establecidas de captura, logrando registrar 19 especies diferentes en la provincia del Guayas clasificando a cada animal de acuerdo a su género y especie en base a manual de tirira, en su mayoría se encontraron 37,8% *Molossus molossus* (45/119) y 11,7% *Desmodus rotundus* (14/119) ambas especies con características diferentes tanto en su alimentación, comportamiento y efecto para el ecosistema, por último se obtuvo un 7% (9/119) de animales positivos a la ampliación de genes mediante PCR anidada punto final correspondientes a Pancoronavirus (alfa y beta), siendo este el primer estudio de este tipo ejecutado a nivel nacional, dándole paso a la confirmación del papel del murciélago como reservorio de enfermedades en el país.

Palabras claves: Alfa coronavirus, Beta CORONAVIRUS, Ecosistema, Pancoronavirus, PCR, Zoonótica.

1. Introducción.

La familia de coronavirus logra su diferenciación en cuatro géneros, de los cuales dos de ellos están asociados a enfermedades zoonóticas como lo son alfa y beta provocando diversidad de síntomas desde un simple resfriado hasta complejos neumónicos más graves como el Síndrome respiratorio de Oriente Medio MERS-CoV, Síndrome respiratorio agudo severo 1 SARS-CoV 1 y Síndrome respiratorio agudo severo SARS-CoV 2 (Drexler, Corman, & Drosten , 2020) .

Guerrero (2020) indica que los coronavirus corresponden a virus envueltos de ARN monocatenario, el nombre “corona” se debe a sus proyecciones estructurales presentes en la superficie compuestas de glucoproteínas asociadas a la membrana, proteína S encargada de unión y fusión de membrana y proteína M que promueven la curvatura de la membrana. Desde finales de 1930 se han logrado aislar coronavirus en animales como perros, gatos, cerdos, camellos, aves y principalmente murciélagos los cuales pueden llegar a causar patologías respiratorias, gastrointestinales, reproductivas, neurológicas o hepáticas, con una morbilidad y mortalidad variable y una fácil capacidad de mutación (Omatsu, Watanabe, & Akas, 2017).

CoV corresponde a uno de los grupos más grandes virus que pertenecen al orden Nidovirales, se clasifica en cuatro géneros: alfa coronavirus, beta coronavirus, Gamma coronavirus y Delta coronavirus (Al-Wazzah & Al-Osail, 2017).

1.1 Antecedentes del problema.

Alfa coronavirus y Beta coronavirus hasta el momento se han detectado en murciélagos de diferentes especies en Asia, África, América del Norte, América del Sur y Oceanía dejando en claro una amplia y fácil distribución. Se conoce también que las especies *Rhinolophus sinicus* y *Rhinolophus affinis* o también llamados murciélagos herradura son las especies en las cuales se han encontrado mayores partículas virales correspondientes a Coronavirus (Wong , Li, Lau , & Woo, 2020).

El principal régimen de alimentación de cada especie nos permite establecer categorías independientes como insectívoros, frugívoros, nectarívoros, carnívoros, piscívoros y hematófagos, se conoce que los murciélagos están muy extendidos en áreas urbanas y por ello pueden llegar a entrar en contacto cercano tanto con animales domésticos como con humanos, se cree también que debido a ciertos aspectos como su elevada longevidad, su capacidad de hibernar y su resistencia a ciertos microorganismos convierten a estos mamíferos en excelentes hospedadores para agentes infecciosos (Allocati, y otros, 2020).

Entre los virus más conocidos transmitidos por murciélagos se encuentran, MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV 2, estableciendo a los murciélagos como un reservorio primario por casi un 96% de similitud a nivel del genoma, basado en la caracterización molecular de alfa y beta coronavirus (Al-Wazzah & Al-Osail, 2017).

En el 2012 se detectó por primera vez MERS-CoV en Arabia Saudita, con una mortalidad del 35% de los casos detectados, desde allí se ha secuenciado este virus, una evidencia específica que vinculó a MERS con murciélagos fue a partir

de la amplificación de un fragmento de ARN en un sedimento fecal de la especie *Emballonuridae*, especie insectívora (Mackay & Arden, 2015).

Desde la aparición de MERS-CoV han continuado investigaciones encontrando más beta coronavirus en varios murciélagos *Vespertilionidae*, en los últimos 14 años, se ha descubierto que los murciélagos son hospedadores de al menos 30 coronavirus con secuencias genómicas completas disponibles (Zheng, 2020).

En un estudio llevado a cabo en el 2017 por la universidad de Columbia, se tomaron 19192 muestras entre murciélagos, roedores, primates no humanos y humanos, en los cuales se identificaron aproximadamente 100 coronavirus diferentes, encontrando al menos que el 98% de los animales albergaban CoV, concluyeron también que la diversidad de coronavirus se asemeja con la diversidad de murciélagos, lo que sugiere que los coronavirus evolucionaron o se adaptaron (Columbia University's Mailman School of Public Health, 2017).

La atención a la alta diversidad de CoV que albergan los murciélagos ha aumentado durante la última década debido al alto número de infecciones humanas causadas por dos Beta CoV zoonóticos, SARS-CoV y MERS-CoV, pero es de importante no excluir a Alfa CoV debido que aunque no es zoonótica continúa afectando a otras especies. El análisis filogenético realizado en cepas de CoV de murciélago reveló su correlación evolutiva con cepas humanas, lo que sugiere su origen en murciélagos, el genoma se caracteriza por una alta frecuencia de mutaciones y eventos de recombinación, aumentando su capacidad para cambiar de hospedador y su potencial zoonótico (Wu, Wu, Qun , & Zhicong , 2020).

1.2 Planteamiento y formulación del problema.

1.2.1 Planteamiento del problema.

Para diciembre de 2019 en China Hubei se informó un brote de neumonía desconocida, posteriormente se identificó como SARS-CoV-2 2, perteneciente a beta coronavirus, es el séptimo coronavirus que se sabe que infecta a los humanos logrando causar una enfermedad grave a nivel respiratorio determinando su relación con 96,3% con el coronavirus encontrado en murciélagos, ocasionando una pandemia mundial que hasta abril de 2020 alcanzaba más de 200 países, con más de 1.700.000 casos humanos confirmados y 111.600 muertes, reafirmando el papel importante de los murciélagos en brotes de coronavirus. Al ser un nuevo coronavirus de origen zoonótico es de gran importancia el conocer el rol que desempeña tanto alfa y beta coronavirus en los murciélagos como reservorio, en las diferentes especies que puede llegar a afectar y con su relación en el ambiente (Helmy, Fawzy , Elaswad, Kenney, & Shehata , 2020).

1.2.2 Formulación del problema.

¿Es posible detectar alfa y beta coronavirus en murciélagos de la provincia del Guayas?

¿Existe una relación en los murciélagos como reservorio de alfa y beta coronavirus?

1.3 Justificación del problema.

En la actualidad no existen suficientes estudios que permitan conocer más sobre Alfa y Beta coronavirus de murciélagos en Ecuador o en América latina en general, por ello esta falta de información en un país rico en diversidad de especies de murciélagos revela a su vez un vacío epidemiológico que tiene la necesidad de ser cubierto con más estudios como este, que logre comprender a futuro el papel de alfa y beta en la salud animal y humana, en la región y en el mundo (González, 2018).

Santilán y Palacios (2020) mencionan que Ecuador corresponde al segundo país en Sudamérica con el mayor número de contagios de SARS CoV 2, según The New York Times la cantidad de fallecidos en Ecuador correspondían a 7600 en el periodo del 1 de marzo al 15 de abril, conociendo estos detalles es importante considerar la elevada morbilidad y mortalidad que va ligada con un coronavirus y la susceptibilidad de una sola especie ante este virus, Ecuador en la actualidad alberga un aproximadamente 176 especies de murciélagos por ello la diseminación de este virus es aún más importante si consideramos al murciélago como un reservorio (Wang, Wang, Ye, & Liu, 2020).

En un estudio por Christian Drosten, se ejecutó un protocolo de detección de SARS-CoV 2 en el cual se encontró una marcada diversidad de coronavirus en murciélagos neotropicales presentes en Panamá y Brasil, de las 1868 muestras colectadas 26 especies correspondían a murciélagos también presentes en Ecuador de acuerdo al manual de Tirira, de allí nace la necesidad de conocer la diversidad de coronavirus en Ecuador para poder determinar un posible riesgo en brotes zoonóticos a futuro (Díaz, 2020)

1.4 Delimitación de la investigación.

Espacio provincia del Guayas.

Tiempo 8 semanas post sustentación.

Población diferentes especies de murciélagos de la provincia del Guayas.

1.5 Objetivo general.

Detectar alfa y beta coronavirus en murciélagos de la provincia del Guayas 2020-2021.

1.6 Objetivo específico.

- Identificar taxonómicamente por diversidades de especies de murciélagos que circulan en la provincia del Guayas.
- Caracterizar a las distintas especies de murciélagos y la relación ecológica con su entorno.
- Establecer beta y alfa coronavirus a través de pruebas particulares.

1.7 Hipótesis.

Existe la presencia de alfa y beta coronavirus en las diferentes especies de murciélagos presentes en la provincia del Guayas.

2. Marco Teórico.

2.1 Estado del arte

2.1.1 Coronavirus.

Valitutto, y otros (2020) detectaron cuatro alfa coronavirus PREDICT_CoV-35, 47, 82 y 90 y tres betacoronavirus PREDICT CoV-92, 93 y 96, de estos solo el alfacoronavirus PREDICT_CoV-35 se conocía anteriormente. Las muestras de guano representaron la mayoría de los positivos, lo que sugiere una ruta de transmisión importante para la eliminación de CoV de los murciélagos, en este estudio capturaron y muestrearon un total de 464 murciélagos que representan al menos 11 especies de ocho géneros y seis familias, analizando un total de 759 muestras, entre ellas 464 fueron hisopos orales, 140 hisopos rectales, 155 muestras de guano, de estas muestras 48 fueron positivas: 1 hisopo oral , 7 hisopos rectales de 7 murciélagos diferentes y 40 muestras de guano agrupadas.

Anis, y otros, (2021) evaluaron la presencia de SARS-CoV-2 en el guano de murciélagos silvestres de América del Norte debido a que tienen una alta mutación de CoV, para ello recolectaron 20 muestras de guano de murciélagos aparentemente sanos procedentes de un centro de rehabilitación previo a liberación, posterior a la recolección las muestras se almacenaron para realizar PCR-RT, como resultado todas las muestras salieron negativas, obteniendo así que al menos las 20 muestras de estos murciélagos no contenían SARS CoV 2.

Perlman & Dandekar (2005) mencionan que SARS-CoV posee una similitud genética del 92% a 94% de virus encontrado en murciélagos, el estudio se llevó a cabo con el análisis de sangre, excrementos, muestras respiratorias de más de 400 murciélagos de diferente área de China concluyendo que estos poseían

anticuerpos del virus. Los datos de la secuencia mostraron que la identidad genómica promedio del virus similar es de aproximadamente 87 a 92% (Zhengli & Zhihong , 2008).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Murciélagos.

Los murciélagos son mamíferos pertenecientes al orden Chiroptera, es el segundo orden de mayor diversidad de todos los mamíferos después de los roedores, ocupan todo tipo de hábitats y regiones exceptuando la Antártica, en Ecuador, los quirópteros son el grupo más diverso de mamíferos, conformado por 176 especies, distribuidas y registradas en todo el territorio ecuatoriano, incluyendo las islas Galápagos y los altos páramos, hasta cerca de los 4.500 m de altitud (Martínez & Velázquez, 2019).

La estructura anatómica de los murciélagos corresponde a dos alas con una membrana conocida como patagio, en las orejas poseen una prominencia llamada antitrigo, la cola es un apéndice caudal con un desarrollo que varía de acuerdo con la especie por ello puede o no estar presente, el hocico puede ser largo, delgado, corto o ancho y esto va relacionado a la alimentación (Maryland Deparments, 2019).

La hoja nasal es un apéndice cutáneo característico de la familia Phyllostomidae, además pueden presentar verrugas o papilas con una diferente posición, forma o cantidad de números (Maryland Deparments, 2019).

2.2.3 Estructura de coronavirus.

Los coronavirus están compuestos por una envoltura de lipoproteína, con una sola hebra de ARN que no está segmentada, de forma esférica con un tamaño de 120 a 160 nm de diámetro compuesto por cuatro proteínas estructurales. Glicoproteína S o spike consiste en espículas de 16 a 21 nm correspondientes a la membrana externa encargada de determinar el tropismo del virus, favoreciendo la fusión de la membrana del virus con la porción de la célula, proteína E ensambla y libera el virus, constituye en un factor de virulencia, mientras que la proteína M es una glicoproteína encargada de darle la forma esférica al virus permitiendo que esta se una a la nucleocápside compuesta de proteína N (Castillo, 2016).

En 2012 se presentó el síndrome respiratorio de Oriente medio conocido también como MERS-CoV, se informó por primera vez en península arábiga asociando la enfermedad al murciélago *Taphozous perforatus*, el cual fue considerado como reservorio natural, la presentación clínica es variada, abarca escalofríos, rigidez, mialgias fatiga y tos en un 87% de los pacientes, mientras que en un 35% se informaban síntomas gastrointestinales, que incluían náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal (Huynh, y otros, 2020).

Drexler, Corman, & Drosten, (2020) informó que SARS y MERS-CoV se transmitían desde el huésped principal murciélagos a las civetas de las palmas o los dromedarios, respectivamente, y finalmente a los humanos, tanto el SARS como el MERS-CoV fueron y son altamente patógenos, lo que resultó en 8096 y 2519 casos humanos, con una tasa de mortalidad del 9,6% y el 34,3% en 2003-2004 y 2012, después de la epidemia de SARS, hasta diciembre de 2008, se

agregaron coronavirus con genomas completos secuenciados, estos incluyen dos coronavirus humanos, diez coronavirus de mamíferos, coronavirus equino y coronavirus de ballena beluga y cuatro coronavirus aviares (Woo, Lau, Yi , & Yuen, 2009)

Según el análisis filogenético, el SARS CoV 2 comparte un 96,3%, 89% y 82% de similitud de nucleótidos con murciélago CoV RaTG13, Sars-like CoV ZXC21 y SARS CoV, respectivamente, lo que confirma su origen zoonótico, por lo tanto, se puede suponer que el virus provino originalmente de los murciélagos y se ha transmitido con el tiempo a otros huéspedes animales y, en última instancia, a los humanos, por ello se considera importante el fomentar investigaciones que permitan difundir el comportamiento de CoV en esta especie (Allocati, y otros, 2020).

2.2.4 Acción patógena general.

El nivel de patogenicidad del coronavirus va a ser dependiente del tropismo celular, el cual va a variar de acuerdo a la especie, edad, sistema inmune, por ejemplo en humanos en su mayoría poseen afinidad por células del epitelio respiratorias generando así síndromes netamente respiratorios, sin embargo en porcinos alfa coronavirus genera principalmente enteritis, en ambos ejemplos ocurre una interacción de viriones en el citoplasma de células mediante endocitosis, generando una producción de mediadores inflamatorios (Pecho, Arteaga , Bazan, & Navarro, 2020).

2.2.5 Alfa y beta coronavirus en otras especies.

En la actualidad se conoce que los coronavirus poseen afinidad por diferentes especies como felinos, caninos, porcinos, bovinos, equinos, aves y humanos, todos estos coronavirus tienen un impacto económico significativo.

2.2.6 Alfa coronavirus.

Respecto a alfa coronavirus se agrupan los virus como gastroenteritis transmisible porcina (TGEV) detectada por primera vez en 1973 en cerdos procedentes de Estados Unidos, cuya sintomatología se basaba en vómito, diarrea amarilla profusa, deshidratación y muerte. También se encuentra el coronavirus respiratorio porcino (PCRV) considerado como una variación de TGEV en la proteína S cambiando el tropismo entérico por una afinidad a sistema respiratorio generando una neumonía intersticial, otros alfa coronavirus son el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y coronavirus del síndrome de diarrea aguda porcina (SADS-CoV) (Ricardo & José, 2015).

SADS-CoV o síndrome de diarrea aguda se deriva de los coronavirus de murciélago llamados HKU2, un grupo heterogéneo de virus con distribución mundial es imposible aún predecir si este virus o una cepa de murciélago HKU2, podría surgir e infectar poblaciones humanas, sin embargo, la amplia gama de huéspedes, junto con la capacidad de replicarse demuestra el riesgo potencial de futuros eventos de emergencia en poblaciones humanas y animales (ScienceDaily, 2020).

En caninos el coronavirus presenta un epitelio tropismo invadiendo los eritrocitos de las vellosidades intestinales, afectando principalmente a cachorros asociándose muchas veces a agentes oportunistas como parvovirus,

presentando una sintomatología amplia que abarca melena, hipertermia, deshidratación e inclusive puede llevar a la muerte (Berrezueta, 2014).

Coronavirus felino corresponde a otro alfa coronavirus con dos biotipos, el primer biotipo genera enfermedad entérica leve FECVs mientras que la mutación va a generar FIPVs peritonitis infecciosa felina ambas presentan una prevalencia de entre 20 a 90% en felinos domésticos y silvestres, pero la peritonitis infecciosa felina tiende a ser más severa y fatal ocasionando un compromiso de órganos tales como hígado, cerebro, pulmones y tejido linfático (Valencia, Delgado, & Ruíz, 2021).

No existe una vacuna eficaz o un tratamiento para peritonitis infecciosa felina en la actualidad, e inclusive las pruebas serológicas tienden a tener baja especificidad y sensibilidad, tiende a derivarse en un cuadro grave causando la muerte (Sharif, y otros, 2010).

Acevedo, (2017) menciona que la bronquitis infecciosa corresponde a otro alfa coronavirus implicado en aves con una gran importancia en la producción debido a su impacto económico, posee un tropismo hacia el tracto respiratorio con lesiones patognomónicas pero también se replica en algunas células epiteliales del intestino, riñón y oviducto. Se controla principalmente mediante el uso de vacunas vivas atenuadas, los signos clínicos incluyen estertores traqueales, sibilancia, secreción nasal, etc. (Casais, Thiel, Siddell, Cavanagh, & Britton, 2001).

Saif, (2010) refiere que el coronavirus en los bovinos puede presentarse en adultos como una leve enfermedad respiratoria, pero al combinarse con otros factores como el estrés o fiebre de transporte de ganado, los niveles de cortisol

van a aumentar y a su vez se va a generar una alta dosis de exposición al virus. En terneros se presenta únicamente como neumonía severa, acompañada de secreciones nasales, asociado también a tres síndromes conocidos como diarrea de los terneros, disentería invernala con diarrea hemorrágica e infecciones respiratorias en general (Betancourt, Rodríguez, Relova, & Barrera, 2017).

2.2.7 Beta coronavirus.

Entre los Beta coronavirus presentes en animales se menciona al coronavirus equino como una enfermedad entérica, aislado a partir de una cepa de América del Norte, Europa y Asia, en porcinos se menciona encefalomiелitis hemaglutinante que se caracteriza por generar una aglutinación de eritrocitos, afectando al sistema nervioso central con una mortalidad y morbilidad elevada, fue uno de los primeros CoV porcinos identificados y todavía está muy extendido, causando infecciones subclínicas en cerdos en varios países (Tituana, 2014).

2.2.8 SARS CoV.

Rat, Oliever y Dutot, (2020) mencionan que el primer caso detectado de SARS CoV ocurrió en noviembre del año 2002 en el Sureste de China provincia de Guandong, el primer anuncio oficial de la enfermedad se llevó a cabo el 11 de febrero del 2003 con 300 personas presentando una grave neumonía de carácter atípico y de etiología desconocida, el virus como tal se une a la célula diana hospedadora cuyos receptores corresponden a la enzima convertidora de angiotensina 2 presente en el epitelio bronquial, es decir, infecta a los neumocitos tipo I complicando su función normal generando neumonía, en los tejidos va a aumentar la permeabilidad de los capilares alveolares provocando edema

pulmonar e hipoxia, genera también una infiltración de neutrófilos y un aumento de citoquinas de carácter inflamatorio, la sintomatología abarca fiebre, mialgias, malestar general, disnea, tos e infiltración pulmonar. (Graham, Donaldson, & Baric, 2013).

2.2.9 MERS CoV.

Conocido como Síndrome Respiratorio de Oriente Medio identificado por primera vez en septiembre de 2012 en Arabia Saudita cuyos síntomas simulaban una neumonía atípica de fiebre, tos, expectoraciones y disnea. Hasta el año 2019 MERS había causado ya 861 muertes en 27 países, a diferencia de SARS CoV este infecta a los neumocitos tipo II (Raj, y otros, 2013).

Los dromedarios siguen siendo la única fuente zoonótica documentada de infección humana, pero se han detectado CoV similares al MERS en especies de murciélagos en todo el mundo, así como en dromedarios en todo Oriente Medio y África, aunque el papel de los murciélagos aún no se ha dilucidado por completo, se indica que la investigación y la vigilancia continuas de Los coronavirus en murciélagos están justificados (Dawson, Malik, Parvez, & Morse, 2019).

2.2.10 SARS CoV 2.

Fue identificado en diciembre del año 2019, a través de las muestras recolectadas en un grupo de pacientes con sintomatología correspondiente a una neumonía atípica, los orígenes virales son zoonóticos con un vínculo de genoma de murciélagos, aunque aún no se ha logrado identificar a la especie de reservorio intermedio.

Comparte un 88% a un 90% de similitud con SARS derivados de murciélagos, otra cualidad de este coronavirus es que es capaz de replicarse en gatos, perros y hurones, aunque hasta ahora sus signos clínicos han sido leves (Al-Wazzah & Al-Osail, 2017).

2.2.11 Fisiopatología de Beta coronavirus zoonóticos MERS CoV, SARS CoV, SARS cov 2.

Logran interferir en el sistema encargado del reconocimiento inmune, la rápida replicación se debe a que genera una veloz respuesta inflamatoria en forma de cascada principalmente en el tejido pulmonar, haciendo que se genere actividad por parte de los linfocitos y de macrófagos generando un daño intersticial, por ello se genera una respuesta desequilibrada en la producción de citoquinas, esta cascada de citoquinas va a producir un daño microvascular, activando a su vez la producción de trombina en el sistema de coagulación, inhibiendo la fibrinólisis con una inducción hacia la coagulación intravascular, estos procesos en general se verían asociados a el síndrome atípico de dificultad aguda respiratoria y la falla de órganos de forma múltiple (Dabanch, 2021).

2.2.12 Técnica de Diagnóstico.

2.2.13 PCR.

Kralik y Matteo, (2017) mencionan que PCR es una prueba de oro encargada de detectar, cuantificar y tipificar diferentes organismos tanto en la clínica humana, veterinaria y en seguridad alimentaria. Sus abreviaciones corresponden a reacción en cadena de la polimerasa esta se basa en la replicación de un solo gen en diferentes copias separando las cadenas de ADN donde se encuentra la carga genética, este segmento de gen es localizado cuando se marca con el

cebador, iniciador o también conocido como oligonucleótidos, allí comienza la primera secuencia de ensamblaje mediante cada segmento generando muchas copias que van a ser amplificadas posteriormente (Morley, 2014).

2.2.14 Detección serológica, anticuerpos.

Se debe considerar como indicadores tanto el anticuerpo IgM e IgG como guía para la detección serológica, se conoce que IgM es un indicador en etapa temprana pudiendo persistir en el cuerpo durante 2 meses mientras que, IgG es un indicador de infección actual o previa pudiendo durar más de 3, se puede usar para vigilancia y evaluación epidemiológica a nivel de la población obteniendo una tasa de letalidad, permitiendo monitorear respuestas inmunológicas evaluando el curso, grado y tiempo de la inmunidad generada post infección y un desarrollo de vacunas (Liu & James , 2021).

2.2.15 Otras pruebas de diagnóstico.

En las pruebas directas de antígeno el rendimiento de las mismas va a ser dependiente del tipo de muestra, tiempo de muestreo, errores por una manipulación inadecuada, el tipo de almacenamiento al cual está expuesto y a la reactividad cruzada de inmunoensayos, por ejemplo, muchas veces existen falsos positivos debido a una reactividad cruzada ocasionada por anticuerpos de otros virus o inclusive por enfermedades autoinmunes, otro tipo de prueba es la detección de ácido nucleico mediante la amplificación sintética usando cebadores para detectar organismos específicos (Jee , N Thone, & Young, 2021).

Otro método es el de LAMP o llamado método de amplificación isotérmica mediada por bucle usa el emparejamiento, el ADN amplificado y el ARN en

cadena se marca con cebadores considerada una técnica simple (Benzigar, Bhattacharjee, & Baharfar, 2021).

2.2.16 Prevención

El diagnóstico rápido es crucial para controlar las infecciones por coronavirus y evitar que se propague, pero siempre debería considerarse como fundamental la prevención mediante la vacuna y más aún en los grupos considerados como susceptibles asegurándoles una inmunidad pasiva adecuada (Turlewicz & Pomorska, 2021).

2.3 Marco legal

Artículo 136 correspondiente a texto unificado de legislación secundaria de medio ambiente, fomenta la investigación de extranjeros y de Ecuatorianos mediante decreto ejecutivo 3516 bajo ciertas condiciones tales como: que la investigación o estudio que implique colección de especímenes o elementos de la flora y la fauna silvestres, obtención de datos e información de campo dentro del patrimonio forestal del estado y las que se ejecuten utilizando especies o elementos de la flora y la fauna silvestres tengan el permiso mediado por el Ministerio de Ambiente

3. Materiales y Métodos.

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación correspondió a un estudio transversal del tipo descriptivo exploratorio en donde se colectaron y analizaron datos, fue exploratorio debido a que se conoce muy poco sobre el tema, esta es la primera vez en la cual se toma muestra de murciélagos para detección de alfa y beta coronavirus (Pan coronavirus) mediante pruebas particulares, las capturas se hicieron en base al Manual de Tirira-

3.1.2 Lugar de Estudio.

Las salidas de campo se efectuaron en diez zonas, con tres noches establecidas para cada una, las zonas visitadas fueron Cristo rey, Juntas del Pacífico, Bucay, Durán, Milagro, Reserva Manglar Churute, Pedro Carbo, Balzar, Isla Puná, Daule, cada zona tuvo aproximadamente 8 horas de trabajo, en el cual se incluyó observación previa del lugar para detectar refugios de murciélagos y se procedió a colocar redes de niebla, se anotó el entorno ecológico (presencia de río, lago, árboles) se monitoreo redes, se recolectaron los individuos en cada bolsa de tela diseñada con la finalidad de garantizar comodidad y reducir estrés al individuo y posterior desmontado de redes (Linares & Zabala, 2018).

3.1.3 Diseño de investigación

Correspondió a un estudio transversal descriptivo de tipo no experimental, en el cual se tomó información de murciélagos de la provincia del Guayas, para detectar presencia de pan coronavirus, alfa y beta, clasificando las especies en

base a su taxonomía (especie y *género*) y relacionándola con su entorno ecológico.

3.2. Metodología.

3.2.1 Variable.

3.2.1.1 Variable dependiente.

Tabla 1 variable dependiente.

Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala	Tipo
PCR. Anidado punto final.	Amplificación mayor a 400 bp.	Positivo- Negativo	Número de animales positivos	Nominal.	Cualitativa.

Valencia, 2021.

3.2.1.2 Variable independiente

Tabla 2 variable independiente.

Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala	Tipo
Fecha de captura.	Día, mes de captura	Día y mes.	Día y mes de la captura de los murciélagos.	Nominal.	Cualitativa.
Fecha de necropsia.	Día y mes en el cual se realiza la necropsia y toma de muestra para posteriores pruebas.	Día y mes.	Día y mes del ingreso de los murciélagos para toma de muestra.	Nominal.	Cualitativa.

Zona de captura.	Ubicación de la captura de murciélagos.	Coordenadas de longitud y latitud, también se toma en cuenta si estaba cerca de río, plantaciones.		Provincia del siGuayas.	Nominal.	Cualitativa.
Hora de captura.	Hora y minutos en la captura de murciélagos posterior a la toma de coordenadas.			Hora y minutos.	Discreta.	Cuantitativa.
Sexo.	Se refiere al género del animal Macho Hembra	Número de machos y hembras.		–murciélagos machos y hembras.	Nominal.	Cualitativa.
Características sexuales.	Hace referencia a características específicas de los órganos sexuales.	Se refiere en machos testículos abdominales o testículos escrotales. En hembras presencia de mamas desarrolladas, vulva abierta o cerrada.		Número de hembras con mamás desarrolladas, vulva abierta o cerrada, Número de machos con testículos abdominales o escrotales.	Nominal.	Cualitativa.

Especie	Especie género.	y Especie género murciélago.	y A delconsideración se toma en cuenta el género y especie del murciélago de acuerdo con la ubicación.	Nominal.	Cualitativa.
Cola	Presencia o no de cola, longitud	Cola	Cantidad murciélagos capturados	Continuas	Cuantitativa
Longitud del cuerpo	Largo desde el extremo del hocico hasta el extremo de la cola	Cuerpo	Cantidad murciélagos capturados	Continuas	Cuantitativa
Longitud de la oreja	Largo de la oreja desde su base hasta la punta	Oreja	Cantidad murciélagos capturados.	Continuas	Cuantitativa
Longitud de Antebrazo	Largo del antebrazo desde el codo hasta la base del pulgar	Antebrazo	Cantidad murciélagos capturados	Continuas	Cuantitativa

Longitud de pata	de largo de la pata posterior desde el talón hasta la punta de las garras	Pata	Cantidad murciélagos capturados	Continuas	Cuantitativa
Peso	Peso en gramos del murciélago como clave identificación de especie.	Peso en gramos.	en Gramos	Discreta.	cuantitativa.
Temperatura	Grados Celsius	Números naturales		Discreta.	cuantitativa.
Velocidad de viento	Determinada en Km/H, respecto a velocidad de viento en la zona de captura.	Números naturales		Continua	cuantitativa.
Humedad	Determinada por % de humedad en la zona de captura.	Porcentaje.	Números naturales.	Nominal.	Cualitativa.

3.2.2 Universo y tamaño de la muestra.

Straube y Bianconi (2002), la investigación se establece con una población total desconocida e indeterminada, por ello se procedió a aplicar fórmula exponencial de población infinita, cuyo nivel de confianza fue del 95% con un equivalente de valor crítico de 1.96 para Z, una probabilidad del 5% y un margen de error del 9%

$$n = \frac{Z^2 \times p \times q}{d^2}$$

$$n = \frac{(1,96^2 \times 0,5 \times 0,5)}{0,09^2} = 119 \text{ muestras}$$

3.2.3 Recolección de datos.

La información sobre los murciélagos capturados en la provincia del Guayas será recolectada para elaborar una base de datos.

3.2.4 Tratamientos

Por ser una investigación de tipo no experimental no se hicieron tratamientos.

3.2.5 Recursos.

Materiales bibliográficos

Artículos de revistas científicas, libros, tesis, sitios web.

Materiales de campo y laboratorio.

Se emplearon linternas de cabeza, linterna de mano, guantes gruesos, bolsas de tela para guardar cada murciélago, redes de niebla, tubos de acero 3 metros de largo, piola, cámara fotográfica.

Equipo de protección personal que consta de bata quirúrgica, guantes de nitrilo, mascarilla KN95, cofia, zapatones, algodón, marcadores, cinta de papel, papel de empaque.

Material y equipo de laboratorio: cloroformo, tubos de microcentrífuga, tubos de 15 ml, pipeta automática de 1000 μ l, congelador < 80, algodón, alcohol, cloro, agua destilada, morteros, esterilizador, papel toalla, papel de empaque, vortex, cabina de flujo.

Medio de conservación para la muestra tal como PBS (tapón fosfato salino), PCR anidada punto final.

3.2.6 Métodos y técnicas.

Método de captura de murciélagos: para la captura de murciélagos se emplearon 3 redes de niebla de 9 metros de longitud y 1 de 12 metros de longitud sujetadas por tubos de 3 metros y colocadas en lugares de fácil acceso previamente observados durante el día, se realizaron reconocimientos de refugios o sitios de reposo de los murciélagos para obtener mayor probabilidad de capturas.

Las redes se abrieron 17:00 y se retiraron 00:00, en cada zona de captura se colocaron de 2 a 3 redes en diferentes áreas y se escribieron las características del entorno ecológico (presencia de ríos, lagos, árboles), cada red fue monitoreada con un intervalo de 40 minutos.

Las fechas para salidas de campo fueron establecidas de acuerdo con la fase lunar específicamente luna nueva, conociendo que, en este período con menor

luminosidad lunar se pudieron obtener mayor número y variedad de especímenes, se establecieron fechas excluyendo meses de temporal invernal.

Cada individuo capturado fue retirado de la red usando guantes de protección para evitar mordeduras y fueron colocados en bolsa de telas previamente rotulada con el número de individuo, en ese mismo momento se procedió a anotar la hora de captura exacta para mayor organización.

Método para registrar los datos generales: para registrar los datos de los individuos capturados a través de las redes se creó un formato donde se asentaron las medidas morfométricas en cm tales como largo total desde el extremo del hocico hasta el extremo de la cola, largo de la cola, largo de la oreja desde su base hasta la punta, largo del antebrazo desde el codo hasta la base del pulgar y largo de la pata posterior desde el talón hasta la punta de las garras, se registraron datos biológicos, como sexo y características sexuales, se anotaron también la temperatura de la zona, el % de humedad y presencia de árboles, ríos o lagos relacionado con las especies halladas y su entorno ecológico.

Método de Laboratorio Empleada: previo a la necropsia cada individuo capturado fue sometido a cloroformo, siempre manipulándolo y mediante protocolo que garanticen que no sufre, posterior a ello se pesó y se tomaron las medidas antes mencionadas, se realizó el hisopado oral y rectal, después la disección se colocó en el tubo de PBS pulmones, tráquea, riñón y porción de intestino para ser almacenado en -80 C.

Se realizó la extracción de ARN viral mediante el método de columna kit comercial Zymo, Biocomma, Gen Jet Invitrogen para obtener ADN complementario y primera PCR.

Se empleó los primers Forward: 5'-GGKTGGGAYTAYCCKAARTG-3' y Reverse: 5'-TGYTGTSWRCARAAAYTCRTG-3', para la segunda PCR anidada se usaron los primers Forward: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3' y Reverse: 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCAT-3' y obtener resultados (K W Chu, y otros, 2011).

Cada cuerpo del individuo fue rotulado en la pata con el número correspondiente a su captura para almacenarlo en alcohol y se identificó la especie y el género de especies mediante Tirria (2007).

3.2.7 Análisis estadístico

Una vez obtenido los datos, se emplearon utilitarios tales como Excel desarrollando variables y se representaron mediante técnicas estadísticas como tablas de frecuencia y gráficos de pasteles/barras de Excel.

4. Resultados

4.1 Determinación taxonómica de murciélagos de la provincia del Guayas.

En el trabajo de campo se logró capturar 119 murciélagos en las diferentes zonas establecidas previamente a estudio, cada individuo fue analizado con la finalidad de ser clasificado taxonómicamente en base al manual de Tirira última edición.

Tabla 3 Frecuencia de género y especie de murciélagos capturados en la provincia del Guayas.

	Género	Especie	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa %
1	<i>Anoura</i>	<i>sp.</i>	6	5
2	<i>Artibeus</i>	<i>concolor</i>	2	1,7
3	<i>Artibeus</i>	<i>fraterculus</i>	8	6,7
4	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	6	5
5	<i>Artibeus</i>	<i>rosenbergi</i>	2	1,7
6	<i>Artibeus</i>	<i>sp.</i>	5	4,2
7	<i>Carollia</i>	<i>castanea</i>	2	1,7
8	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	3	2,5
9	<i>Chiroderma</i>	<i>trinitatum</i>	3	2,5
10	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	14	11,7
11	<i>Eptesicus</i>	<i>inoxius</i>	4	3,3
12	<i>Phyllostomus</i>	<i>discolor</i>	4	3,3
13	<i>Phylloderma</i>	<i>stenops</i>	3	2,5
14	<i>Sturnira</i>	<i>bakeri</i>	3	2,5
15	<i>Saccopteryx</i>	<i>bilineata</i>	2	1,7

16	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	3	2,5
17	<i>Molossus</i>	<i>molossus</i>	45	37,8
18	<i>Myotis</i>	<i>nigricans</i>	2	1,7
19	<i>Mycronycteris</i>	<i>Sp.</i>	2	1,7
Total			119	100%

Valencia, 2021.

En la tabla 3 se observa 19 tipos de murciélagos en base a su género y especie, de ellas resaltan *Molossus molossus* con 37,8%, seguido de *Desmodus rotundus* (11,7%).

Tabla 4 Caracterización de las distintas especies de murciélagos capturados y su entorno ecológico.

	Cristo Rey	Juntas del Pacífico	Brisas de Santay	Milagro	Bucay	Balzar	Manglar Churute	Pedro Carbo	Isla Puná	Daule	Total
<i>Anoura</i>				1		4		1			6
<i>Artibeus</i>	5		3		1	3	4	3	3		23
<i>carollia</i>	1	1		1		2					5
<i>Chiroderma</i>	3										3
<i>Desmodus</i>	3	1						9		1	14
<i>Eptesicus</i>			1						3		4
<i>Phyllostomus</i>								2		2	4
<i>Phylloderma</i>					1	2					3
<i>Sturnira</i>					1	2					3
<i>Saccopteryx</i>							2				2
<i>Glossophaga</i>				1	1				1		3
<i>Molossus</i>			1	8	2	6	16	7	5		45
<i>Myotis</i>					1		1				2
<i>Mycronycteris</i>	1								1		2
Total	13	2	5	11	7	19	23	22	13	3	119

Valencia, 2021.

En la tabla 4 se observan 14 especies diferentes de murciélagos capturados en base a cada zona establecida, obteniendo *Molossus* 45/119 y *Artibeus* 23/119.

Tabla 5 Frecuencia absoluta y relativa de murciélagos capturados características de temperatura y humedad de las zonas establecidas.

Lugar	Temperatura °C	Humedad %	Velocidad de viento KM/H	Frecuencia absoluta Murciélagos capturados	Frecuencia relativa %
Cristo rey - Juntas del pacífico	23	76	21	15	12,61
Brisas de Santay- Milagro.	26	73	21 10	16	13,45
Bucay	25	82	11	7	5,88
Balzar	25	70	10	19	15,96
Manglar churute- Pedro Carbo	22	72	6-9	45	37,81
Isla Puná	25	74	16	13	10,92
Daule	31	49	10	3	2,52
Total				119	100%

Valencia, 2021.

El 37,81% de murciélagos fueron capturados en Manglar churute y Pedro Carbo, ambas zonas con una temperatura y un % de humedad similar en rango, otra zona con buen número de captura fue Balzar 15,96%.

4.3. Determinación de la presencia de alfa y beta coronavirus

(Pancoronavirus) en murciélagos de la provincia del Guayas.

Tabla 6 Frecuencia de alfa y beta coronavirus en murciélagos de la provincia del Guayas.

Pan coronavirus	Frecuencia	
	absoluta	Frecuencia relativa
Positivo	9	7,56%
Negativo	110	92,43%

Elaborado por Valencia, 2021.

De las 119 muestras destinadas para el estudio (pulmón, tráquea, porción de intestino, riñón e hisopado rectal y oral) obteniendo positivo a Pancoronavirus un (7,56%) y un negativo de (92,43%).

4.2 Determinación de Especie, género y características del entorno ecológico de murciélagos positivos a Pancoronavirus.

Tabla 7 Determinación de especie y género de los murciélagos positivos a Pancoronavirus capturados, zona y su característica.

Código de murciélago	Ubicación	Entorno ecológico de la zona	Especie	Género
Pm-01	Cristo Rey	Cercana a río, vegetación seca	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>
Pm-02	Cristo Rey	cercana a río, vegetación seca	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>
Pm-03	Cristo Rey	cercana a río, vegetación seca	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>

Pm-04	Cristo Rey	cercana a río, vegetación seca	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>
Pm-05	Cristo Rey	cercana a río, vegetación seca	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>
Pm-11	Cristo Rey	cercana a río, vegetación seca	<i>Chiroderma</i>	<i>trinitatum</i>
Pm-12	Cristo Rey	Árbol de papaya	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>
Pm-13	Cristo Rey	cercana a río, vegetación seca	<i>Sturnira</i>	<i>sp.</i>
Pm-14	Juntas del Pacífico	Árbol de papaya	<i>Sturnira</i>	<i>sp.</i>

Valencia, 2021.

Cada murciélago fue registrado con un código Pm # (número de captura), Pm-01, 02, 03, 04, 05, 11, 12, 13 y 14 correspondieron a murciélagos positivos a alfa y beta coronavirus, 8 de ellos capturados en Cristo Rey y 1 en Juntas del Pacífico, los murciélagos *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Chiroderma trinitatum* y *Sturnira* fueron capturadas en ambiente cercano a río, vegetación seca y vegetación frutal (árbol de papaya), estas especies basan su alimentación en insectos, néctar y frutas respectivamente.

5. Discusión

En este estudio se capturaron murciélagos con la finalidad de determinar especie, entorno ecológico y principalmente detectar alfa y beta coronavirus, se logró registrar 19 especies diferentes en la provincia del Guayas en tan solo 9 zonas, en su mayoría se encontraron 37,8% *Molossus molossus* (45/119) y 11,7% *Desmodus rotundus* (14/119) ambas especies con características diferentes tanto en su alimentación, comportamiento y efecto para el ecosistema, existen limitaciones para comparar este estudio con otro debido a que no existe una investigación a nivel nacional en el cual se ejecute un trabajo de campo como el nuestro. Sin embargo, en un estudio realizado en Perú por Arias, Pacheco, Cervantes, Aguilar y Alvarez (2016). En una reserva con clima parecido a nuestras zonas de estudio en general, se lograron capturar 408 murciélagos clasificándolos por familia obteniendo Phyllostomidae 83,3% (338/408), *vespertilionidae* 13,8% (56/408), porcentajes totalmente diferentes a los nuestros, hay que recalcar que, aunque en Perú tengan mayor número de murciélagos por familia capturada. En nuestro estudio tuvimos mayor variedad en género y especie, este resultado se debe principalmente a que en Ecuador contamos con el 10% de especies de murciélagos a nivel nacional, aproximadamente 173 aunque se sospecha que existen especies de chiropteros aún no registradas, en cambio en Perú la diversidad de especie es menor alcanzando 160 especies (Bats Conservation International, 2022).

En el presente estudio el mayor número de capturas se obtuvo en reserva manglar Churute y Pedro Carbo, esto se puede atribuir a factores climáticos, disponibilidad de recursos y refugios que ofrecen ambas zonas, algunos

estudios comprueban que el clima, la humedad, temperatura, velocidad de viento, lejanías a la ciudad, riqueza de cultivos influyen directamente en la riqueza de murciélagos (Arias , Pacheco , Cervantes, Aguilar, & Alvarez, 2016).

En un estudio realizado por Lecis, Mucedda , Pidinchedda, Pittau, & Alberti, (2018) en la isla Cerdeña de Italia con una muestra de 46 murciélagos se identificaron 15 especies diferentes capturada en zonas urbanas túneles, casas y edificios abandonados, considerando el ecosistema presente en esta isla podemos determinar la capacidad de adaptación de ciertas especies para sobrevivir en diferentes ecosistemas. En Italia únicamente existen 21 especies de murciélagos, por ende, nuestros resultados son diferentes a estos, debido a que nuestro menor número de captura tanto en especie y género como en número de murciélagos ocurrieron en zonas urbanas y la mayor diversidad de especie la obtuvimos en zonas con características de campo y reserva aproximadamente un 35,29%.

El PCR anidado punto final en este estudio nos dio resultados positivos a Pan coronavirus en 9 de los 119 murciélagos capturados, en su mayoría correspondientes a la especie Carollia, este número representaba un 7,56% de las muestras totales.

Desde la aparición de enfermedades de carácter zoonótico ha surgido la necesidad de continuar investigaciones en esta especie para de cierta forma prevenir pandemias como la que cursamos, este es el primer estudio realizado en el país e inclusive el primero de Latinoamérica en lograr obtener un 7,56% de murciélagos positivos a Pancoronavirus que obviamente incluyen beta

coronavirus y alfa coronavirus, en un estudio parecido hecho en Camboya con una muestra más grande de 430 murciélagos solo mediante hisopados rectales y orales obtuvieron 3,72% de positivos para Pancoronavirus (Delaune, y otros, 2021). Mediante otra prueba particular tal como PCR -RT SYBR en Italia con 45 muestras de guano identificaron beta coronavirus similar a SARS-COV en 19 de ellas, obteniendo un 42% de positivos, siendo este un estudio con mejores resultados que el nuestro y hasta el momento el de mejores resultados en su país de origen, estos resultados pueden reflejar una diferencia total en la prevalencia de coronavirus en los murciélagos de Italia pero también puede estar asociado a los diferentes métodos de detección viral implementado.

6. Conclusiones

En este estudio se determinó que el 37,8% de las especies capturadas correspondían a *Molossus molossus* seguido de un 11,7% correspondientes a *Desmodus rotundus*, especies con características totalmente diferentes en su alimentación, características morfológicas y comportamiento, encontramos también una variedad de 19 especies, estas correspondientes a un 12% de las especies totales presentes en el Ecuador, a su vez asociamos que el mayor índice de captura 35,29% lo obtuvimos en zonas con un clima templado húmedo, de rica vegetación, lejana a la ciudad y reservas concluyendo que puede existir relación existente entre calidad de ecosistema, riqueza en diversidad y número de murciélago.

También se logró identificar mediante PCR anidada punto final que el 7,56% (9/119) murciélagos dieron como positivo a Pancoronavirus, determinando que presentan un alfa o beta coronavirus, siendo este uno de los primeros estudios a nivel nacional en confirmar la presencia de coronavirus en murciélagos y demostrar la capacidad de los murciélagos de Ecuador en actuar como reservorio de virus que aún no conocemos y que puedan llegar a ser potenciales patógenos para enfermedades zoonóticas.

7. Recomendaciones

Debido a la falta de literatura sobre este tema en el país se recomienda continuar con investigaciones de la presencia de Pancoronavirus en murciélagos, inclusive a identificar qué tipo de alfa y beta coronavirus está presente en ellos. Se sugiere también realizar estudios de la diversidad de murciélagos en Ecuador caracterizándose por zonas específicas para relacionarla con su entorno y saber más sobre el comportamiento individual de cada especie considerando la importante diversidad en el país.

8. Bibliografía

- Allocati, N., Petrucci, G., Giovanni, D., Masulli, N., Illio, D., & Laurenz, V. (2020). Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discov.* . doi:10.1038/cddiscovery.2016.48
- Balboni, A., Gallina, L., Palladini, A., Santino, P., & Mara, B. (2012). A Real-Time PCR Assay for Bat SARS-Like Coronavirus Detection and Its Application to Italian Greater Horseshoe Bat Faecal Sample Surveys. *ScientificWorldJournal.* . doi:10.1100/2012/989514
- Betancourt, A., Rodríguez, E., Relova, D., & Barrera, M. (2017). Aislamiento de Coronavirus Bovino en Cuba. *Rev Salud Anim.*, 29(2), 6. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2007000200011&script=sci_arttext&lng=pt
- Delaune, D., Hul, V., Karlsson, E., Hassanin, A., Tey, P., & Artem, B. (2021). A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia. *Nat comun* . doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26809-4>
- Morley, A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif*, 1(1), 1. doi: 10.1016/j.bdq.2014.06.001
- ScienceDaily. (October de 2020). Swine coronavirus replicates in human cells. *University of North Carolina at Chapel Hill*, 1-3. Obtenido de <https://www.sciencedaily.com/releases/2020/10/201014082754.htm>

- Acevedo, A. (2017). Virus de la bronquitis infecciosa: un desafío para la avicultura. *Rev Salud Anim.*, 39(3), 5. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2017000300007
- Al-Wazzah, M., & Al-Osail, A. (2017). The history and epidemiology of Middle East respiratory syndrome corona virus. *Multidiscip Respir Med.*, 12-20. doi:10.1186/s40248-017-0101-8
- Anis, E., Turner, G., Ellis, J., Di Salvo, A., Barnard, A., Carroll, S., & Murphy, L. (2021). Evaluation of a Real-time RT-PCR Panel for Detection of SARS-CoV-2 in Bat Guano. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(2), 331. doi:<https://doi.org/10.1177/1040638721990333>
- Arias , E., Pacheco , V., Cervantes, K., Aguilar, A., & Alvarez, J. (2016). Diversidad y composición de murciélagos en los bosques montanos del Santuario Nacional Pampa Hermosa, Junín, Perú. *Rev.Peru.Biol*, 23. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v23i2.12381>
- Bats Conservation International. (2022). Bats Protection Ecuador. *Bats*, 34(3). Obtenido de <https://www.batcon.org/article/protecting-ecuadors-bats/>
- Benzigar, M., Bhattacharjee, R., & Baharfar, M. (2021). Current methods for diagnosis of human coronaviruses: pros and cons. *Graduate School of Biomedical Engineering*, 413, 2311–2330. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-020-03046-0>
- Berrezueta, J. (2014). Diagnóstico de Coronavirus Canino Mediate la Prueba de Elisa en Cantón el Guabo. *Universidad Técnica de Machala*, 31-35.

Obtenido de

http://186.3.32.121/bitstream/48000/1450/7/CD522_TESIS.pdf

Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. (28 de Mayo de 2020). Tree shrew

Encyclopedia Britannica. *Britannica*. Obtenido de

<https://www.britannica.com/animal/tree-shrew>

Casais, R., Thiel, V., Siddell, S., Cavanagh, D., & Britton, P. (2001). Reverse

Genetics System for the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus.

Journal of Virology, 75(24), 5. doi:10.1128/JVI.75.24.12359-12369.2001

Castillo, C. (2016). Infecciones emergentes causadas por coronavirus MERS-

Cov, SARS-Cov. *Universidad de Sevilla*, 7-8. Obtenido de

<https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65125/CASTILLO%20MARTIN%2c%20CRISTINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Columbia University's Mailman School of Public Health. (june de 2017). Bats are

the major reservoir of coronaviruses worldwide. *ScienceDaily*. Obtenido

de www.sciencedaily.com/releases/2017/06/170612094104.htm

Dabanch, J. (2021). Emerging Sars-Cov-2. Basic Information About

Epidemiology, Origin Source, Structure and Pathogenicity of Sars-Cov-2

for Clinicians. *Revista Médica Clínica Los Condes*, 32(1), 14-19.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2020.12.003>

Dawson, P., Malik, M., Parvez, F., & Morse, S. (2019). What Have We Learned

About Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Emergence in

Humans? A Systematic Literature Review. *Vector Borne Zoonotic Dis.*,

19(3), 174-192. doi: 10.1089/vbz.2017.2191

Díaz, I. (2020). Interpretación de las pruebas diagnósticas del virus SARS-COV

2. *Acta Pediatr Mex*, 40(1). Obtenido de

<https://www.medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2020/apms201h.pdf>

Drexler, J., Corman, V., & Drosten, C. (2020). Ecology, evolution and

classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral*

Res, 6. doi:10.1016/j.antiviral.2013.10.013

Francisco, E., Souza, F., Hiran, C., Beatriz de Carvalho, H., Carnielli, P.,

Paulo, S., . . . Franco, A. (2013). Detection of Alphacoronavirus in velvety

free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats

(*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. *Virus Genes*,

47(1). doi:10.1007/s11262-013-0899-x

Goncalves, J., Rozental, T., Guterres, A., Rodrigues, B., Andrade, B., Fraga, S.,

. . . Sampaio, A. (2020). Investigation of *Bartonella* spp. in Brazilian

mammals with emphasis on rodents and bats from the Atlantic Forest. *Int*

J Parasitol Parasites Wildl, 8. doi:0.1016/j.ijppaw.2020.07.004

González, M. (2018). Zoonotic emergence of coronavirus: a potential public risk

for Latin America. *Rev.MVZ Córdoba*, 3, 6775-6777.

doi:<https://doi.org/10.21897/rmvz.1408>

Graham, R., Donaldson, E., & Baric, R. (2013). A decade after SARS: strategies

for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 11(12), 836.

doi:10.1038/nrmicro3143

- Guerrero , S. (28 de Agosto de 2020). Coronavirus en Ecuador: Una opinión desde la Academia. *Revista Ciencias de la Vida- La Granja*, 32(2), 12. doi:http://orcid.org/0000-0003-3473-7214
- Helmy, Y., Fawzy , M., Elasad, A., Kenney, S., & Shehata , A. (2020). The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J Clin Med*. doi:10.3390/jcm9041225
- Huynh, J., Li, S., Yount, B., Smith, A., C, J., Sturges, L., . . . B., M. (2020). Evidence Supporting a Zoonotic Origin of Human Coronavirus Strain NL63. *J Virol*. doi:10.1128/JVI.00906-12
- Jee , Y., N Thone, M., & Young, J. (2021). COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Adv Drug Deliv Rev*, 170, 1-25. doi:10.1016/j.addr.2020.12.011.
- Kralik , P., & Matteo , R. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol*. (108), 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00108
- Lecis, R., Mucedda , M., Pidinchedda, E., Pittau, M., & Alberti, A. (2018). Molecular identification of Betacoronavirus in bats from Sardinia (Italy): first detection and phylogeny. *Virus Genes*, 55(1), 66-67. doi:10.1007/s11262-018-1614-8
- Liu, G., & James , R. (2021). COVID-19 Antibody Tests and Their Limitations. *ACS Sens*. doi:10.1021/acssensors.0c02621

- Mackay, I., & Arden, K. (2015). MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Viol J.*, 12, 222. doi: 10.1186/s12985-015-0439-5
- Martínez , E., & Velázquez, Z. (2019). La otra cara de los murciélagos. *Revista Yu'am*, 3(6), 46-49. Obtenido de <https://www.revistayuam.com/wp-content/uploads/2019/09/La-otra-cara-110919.pdf>
- Maryland Departments. (2019). Maryland Bat Identification Dichotomous Key. *Departments of natural resources*, 3. Obtenido de https://dnr.maryland.gov/wildlife/Pages/plants_wildlife/bats/bat_key.aspx
- Omatsu, T., Watanabe, S., & Akas, H. (2017). Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* , 30(5), 357–374. doi:10.1016/j.cimid.2007.05.006
- Pecho, S., Arteaga , K., Bazan, B., & Navarro, A. (2020). Extrapulmonary complications of COVID-19 disease. *Revista Peruana de Investigación en Salud*, 183-189. doi:<https://doi.org/10.35839/repis.4.4.775>
- Perlman , S., & Dandekar, A. (Dec de 2005). Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat Rev Immunol*, 12(9), 17-27. doi:10.1038/nri1732
- Raj, S., Mou, H., Smits, S., Dekkers, D., Muller, M., Dijkman, R., . . . Haagmans, B. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 251–254. doi:<https://doi.org/10.1038/nature12005>
- Rat, P., Oliever, E., & Dutot, M. (2020). SARS-CoV-2 vs. SARS-CoV-1 management: antibiotics and inflammasome modulators potential. *Eur*

Rev Med Pharmacol Sci, 24(14), 7880-7885.

doi:10.26355/eurrev_202007_22293

Ricardo, P., & José, M. (2015). Coronavirus en Porcinos: importancia y presentación del Virus de la Diarrea Epidémica en Colombia. *Rev. Med. Vet*, 29, 73-89. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n29/n29a08.pdf>

Rodhain, F. (2020). Bats and Viruses: complex relationships. *Bull Soc Pathol Exot*, 89. doi: 10.1007/s13149-015-0448-z

Saif, L. (2010). Bovine Respiratory Coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 26(2), 349–364. doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.005

Santilán, A., & Palacios, S. (2020). Caracterización epidemiológica de Covid-19 en Ecuador. *InterAm J Med Health*, 2-4. doi: <https://doi.org/10.31005/iajmh.v3i0.89>

Sharif, S., Suri, S., Hair-Bejo, M., Rahman, A., Allaudin, N., & Alazawy, A. (2010). Diagnostic Methods for Feline Coronavirus: A Review. *Hindawy*. doi:<https://doi.org/10.4061/2010/809480>

Tituana, D. (2014). Diagnóstico de Coronavirus Mediante la Técnica de Elisa en Cantón Santa Rosa. *Universidad Técnica de Machala*, 1, 28. Obtenido de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1537/7/CD544_TESIS.pdf

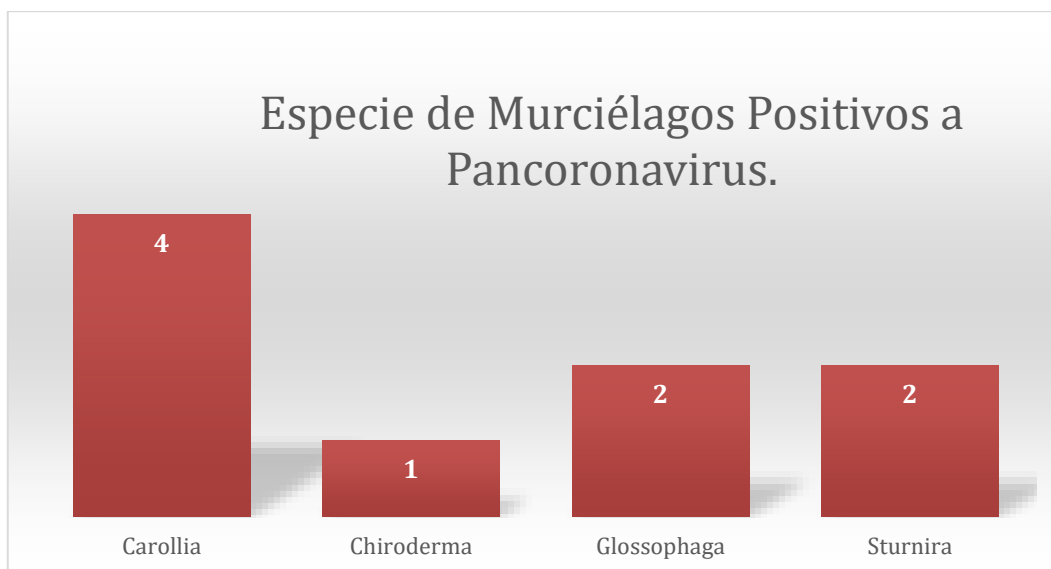
Turlewicz, H., & Pomorska, M. (2021). Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Art. Virol. Sin*, 1. doi:<https://doi.org/10.1007/s12250-021-00364-0>

- Valencia, A., Delgado, K., & Ruíz, J. (2021). Diagnóstico Serológico y Molecular del Coronavirus Felino en las Américas. *Revista MVZ Córdoba*, 26(2), 8. doi: <https://doi.org/10.21897/rmvz.2041>
- Valitutto, M., Aung, O., Yan, K., Vodzak, M., Zimmerman, D., Yu, J., . . . Mazet, J. (9 de Abril de 2020). Detection of novel coronaviruses in bats in Myanmar. *Journal Plos*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230802>
- Wang, L., Wang, Y., Ye, D., & Liu, Q. (2020). Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents*. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105948
- Wong, A., Li, X., Lau, S., & Woo, P. (2020). Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses*, 174. doi: 10.3390/v11020174
- Woo, P., Lau, S., Yi, H., & Yuen, K. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med*, 5. doi:10.3181/0903-MR-94
- Wu, D., Wu, T., Qun, L., & Zhicong, Y. (2020). The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. 44–48. doi:10.1016/j.ijid.2020.03.004
- Zheng, J. (2020). SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *Int J Biol Sci*, 16. doi:10.7150/ijbs.45053
- Zhengli, S., & Zhihong, H. (2008). A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res*, 74-87. doi:10.1016/j.virusres.2007.03.012

9. Anexos.

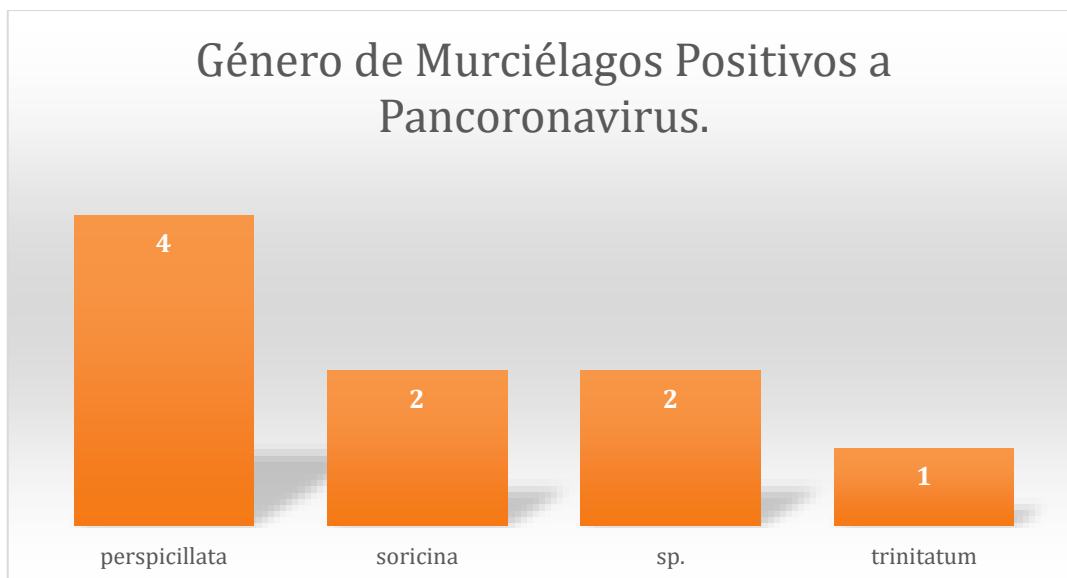
9.1 Gráficos

Ilustración 1 Frecuencia absoluta de especies de murciélagos capturados en las zonas establecidas de la provincia del Guayas.



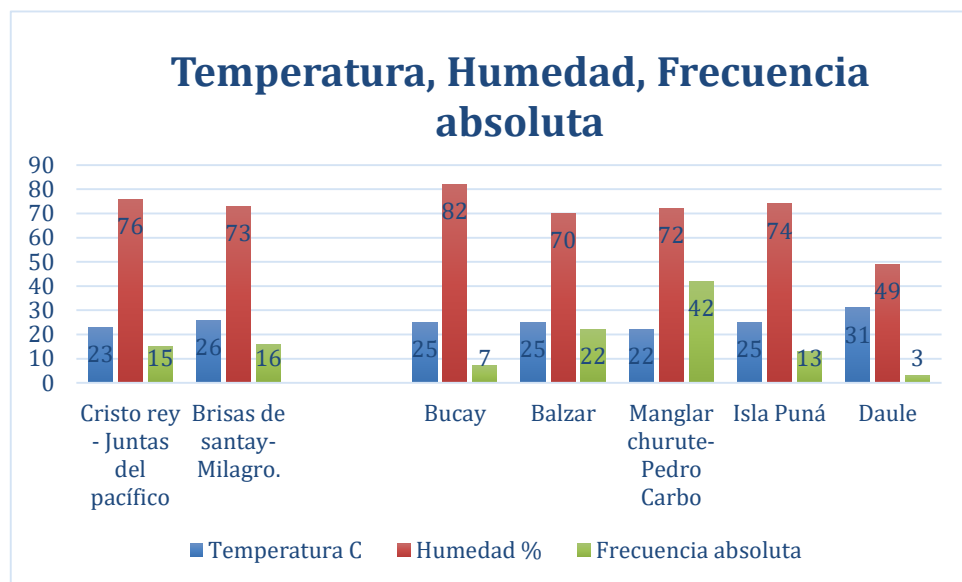
Valencia, 2021.

Ilustración 2 Frecuencia absoluta de género de murciélagos capturados en las zonas establecidas de la provincia del Guayas.



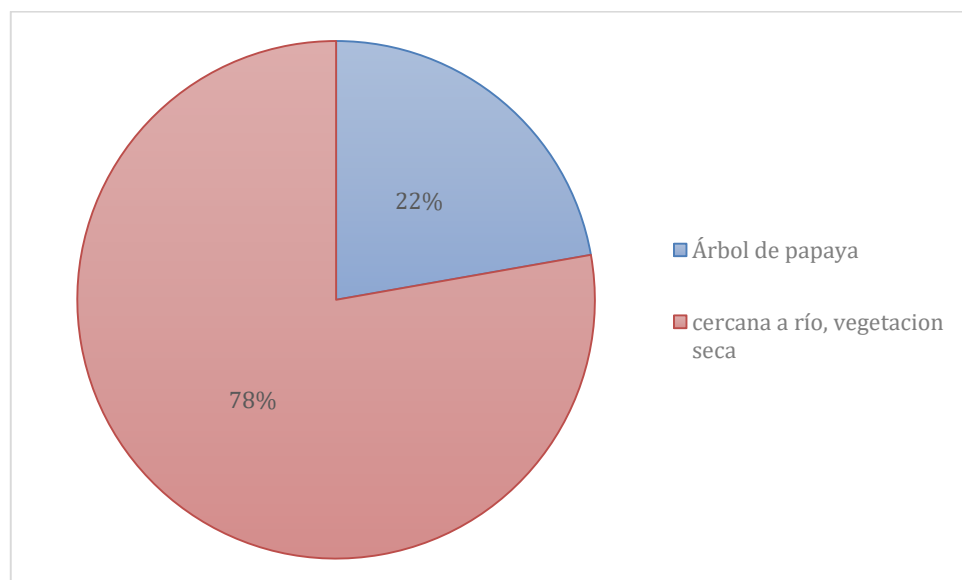
Valencia, 2021.

Ilustración 3 frecuencia absoluta de captura de murciélagos en las zonas previamente establecidas en conjunto a su temperatura y humedad.

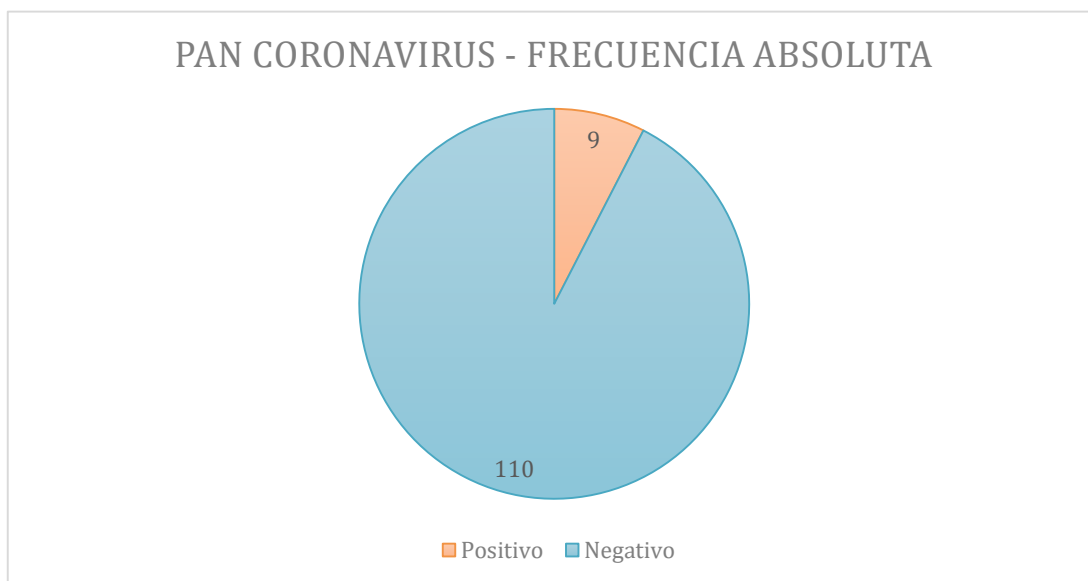
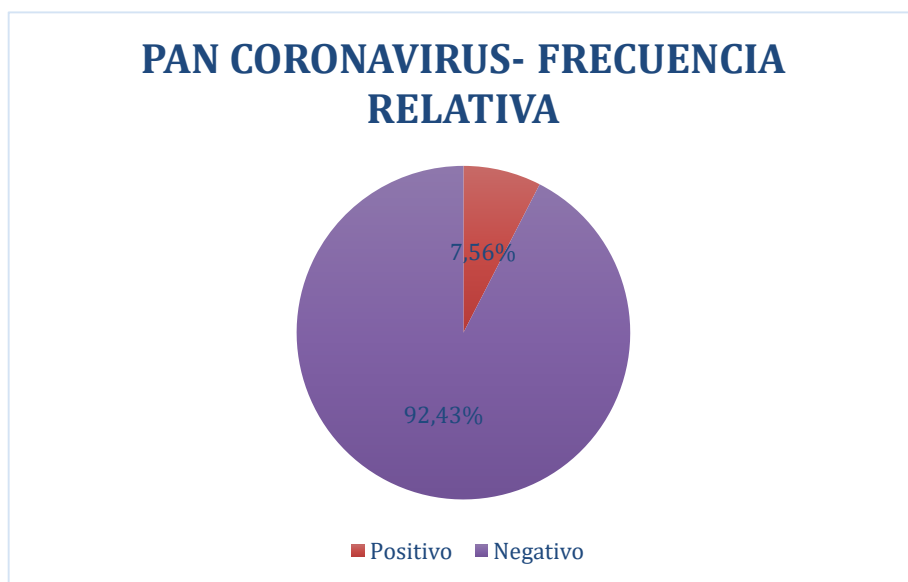


Valencia, 2021.

Ilustración 4 Determinación características del entorno ecológico de murciélagos positivos a Pancoronavirus.



Valencia, 2021.

Ilustración 5 Pan coronavirus frecuencia absoluta.**Valencia (2021)****Ilustración 6 Pan coronavirus frecuencia relativa.****Valencia (2021)**

Anexos 9.2 fotografía de trabajo de campo y laboratorio.

Ilustración 7 Identificación de lugar y colocación de redes de niebla.



Ilustración 8 captura de murciélagos.



Ilustración 9 Ejemplar de *Carollia perspicillata*.



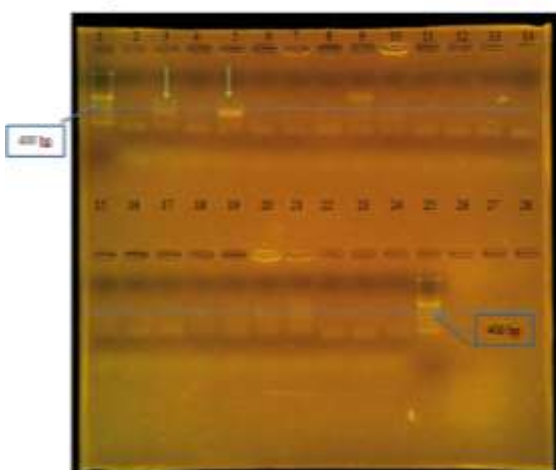
Ilustración 10 Ejemplar de *Desmodus rotundus*



Ilustración 11 Extracción de ARN para pruebas particulares.



Ilustración 12 Amplificación de RdRp (440 bp), se realizó la prueba a través de la *amplificación de la secuencia de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp) por PCR anidada punto final*.



Obtenido de Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación, INSPI, 2021