Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Caracterización de las variantes de coronavirus presentes en especies de murciélagos de Cataluña – España

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

Diego Antonio UREÑA CARRASCO

ASESOR

Dr. Wilser Andrés GARCÍA QUISPES

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ureña, D. (2026). *Caracterización de las variantes de coronavirus presentes en especies de murciélagos de Cataluña – España*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Diego Antonio Ureña Carrasco
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74881057
URL de ORCID	
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Wilser Andrés García Quispes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40480447
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6628-2985
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Egma Marcelina Mayta Huatuco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06175080
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Pedro Eduardo Romero Condori
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	44009312
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Dennisse Cinthya Ruelas Pacheco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46652530
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.1.3 Diversidad Genética
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona País: España Departamento: Cataluña Provincia: Barcelona Distrito: Cerdanyola del Valles Centro poblado: Bellaterra Urbanización: - Manzana y lote: - Calle: Entrada Sud Edifici de Ciències, Carrer de la Vall Moronta Latitud: 41.5008 Longitud: 2.1086
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Marzo 2022 - noviembre 2022
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Otras temas de biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.16

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 14:40 horas del 23 de marzo de 2026, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **DIEGO ANTONIO UREÑA CARRASCO.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.º UNMSM-20240057522**, el titulando expuso su Tesis: **CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE CORONAVIRUS PRESENTES EN ESPECIES DE MURCIÉLAGOS DE CATALUÑA - ESPAÑA** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 13, calificativo: Aprobado.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **DIEGO ANTONIO UREÑA CARRASCO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo Título, conforme a ley.

Siendo las 16:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de marzo de 2026.

Dra. EGMA MARCELINA MAYTA HUATUCO
(PRESIDENTA)

Dr. WILSER ANDRES GARCIA QUISPES
(ASESOR)

Dra. DENNISSE CINTHYA RUELAS PACHECO
(MIEMBRO)

Dr. PEDRO EDUARDO ROMERO CONDORI
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Wilser Andrés García Quispes en mi condición de asesor acreditado con el **Dictamen de la Escuela Profesional N° 02-2026-EPGBT-FCB** de la tesis, cuyo título es "Caracterización de las variantes de coronavirus presentes en especies de murciélagos de Cataluña – España", presentado por el bachiller Diego Antonio UREÑA CARRASCO para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 3 % de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo.

Lima, 26 de febrero de 2026

Firma del Asesor 

Nombres y Apellidos del asesor: Wilser Andrés García Quispes

DNI: 40480447

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

RESUMEN

La emergencia sanitaria provocada por el coronavirus SARS-CoV-2, ha incrementado la tasa de fallecimientos a nivel mundial y ha resaltado la importancia de comprender la diversidad de estos virus. Diversos estudios indican que los murciélagos son reservorios de una gran cantidad de coronavirus, entre ellos, patógenos que pueden infectar a humanos. El objetivo de la presente investigación fue identificar los coronavirus presentes en muestras de epitelio nasofaríngeo de especies de murciélagos de Cataluña, España, y explorar de forma preliminar sus relaciones filogenéticas con el SARS-CoV-2. Cataluña muestra la mayor cantidad de especies de murciélagos en la península Ibérica, siendo los géneros más representativos *Pipistrellus, Myotis* y *Barbastella*. A partir de 100 muestras de hisopado nasofaríngeo de murciélagos de 15 especies presentes en Cataluña. Se aplicaron diferentes métodos de amplificación de secuencias, estrategias de metabarcoding, secuenciación de siguiente generación (NGS) y bioinformática. Solo se detectaron coronavirus en tres especies de murciélagos: seis especies de coronavirus en muestras de *Barbastella barbastellus* (N= 5), cinco en *Myotis bechsteinii* (N= 22) y nueve en *Myotis emarginatu*s (N= 5). Entre estos virus, se identificaron dos relacionados filogenéticamente a los del tipo SARS-CoV, por lo que podrían tener potencial patógeno para el ser humano. Por este motivo, parece razonable recomendar estudios que aborden una posible zoonosis como la causante de la última pandemia de COVID-19. Asimismo, los resultados obtenidos podrían servir de apoyo en la búsqueda del origen específico del SARS-CoV-2.

Palabras clave: coronavirus, filogenia, metabarcoding, SARS-CoV-2, secuenciación de siguiente generación.

ABSTRACT

The health emergency caused by the SARS-CoV-2 coronavirus has increased the death rate worldwide and highlighted the importance of understanding the diversity of these viruses. Several studies indicate that bats are reservoirs for a large number of coronaviruses, including pathogens that can infect humans. The objective of this research was to identify the coronaviruses present in nasopharyngeal epithelium samples from bat species in Catalonia, Spain, and to preliminarily explore their phylogenetic relationships with SARS-CoV-2. Catalonia has the highest number of bat species on the Iberian Peninsula, with the most representative genera being *Pipistrellus*, *Myotis*, and *Barbastella*. 100 nasopharyngeal swab samples from bats of 15 species present in Catalonia were used. Various sequence amplification methods, metabarcoding strategies, next-generation sequencing (NGS), and bioinformatics were employed. Coronaviruses were detected only in three bat species: six coronavirus species were found in samples from *Barbastella barbastellus* (N=5), five in *Myotis bechsteinii* (N=22), and nine in *Myotis emarginatus* (N=5). Among these viruses, two were identified as phylogenetically related to SARS-CoV-2, suggesting they may have pathogenic potential for humans. Therefore, it seems reasonable to recommend studies addressing a possible zoonosis as the cause of the recent COVID-19 pandemic. Furthermore, the results obtained could contribute to the search for the specific origin of SARS-CoV-2.

Keywords: coronavirus, metabarcoding, next generation sequencing, phylogeny, SARS-CoV-2.

DEDICATORIA

A mi madre, que me ha apoyado en todo momento para lograr mis objetivos académicos, tal como la presente investigación.

ÍNDICE

RESUMEN ..... **ii**

ABSTRACT ..... **iii**

DEDICATORIA ..... **iv**

ÍNDICE ..... **v**

I. INTRODUCCIÓN **1**

I.1. Introducción 1

I.2. Descripción de la realidad problemática 2

I.3. Definición del problema 2

I.4. Objetivos 3

I.5. Justificación e importancia de la investigación 3

I.6. Limitaciones de la investigación 4

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA **5**

II.1. Marco teórico 5

II.2. Antecedentes del estudio 6

II.3. Bases teóricas 8

II.4. Definición de categorías de análisis 9

III. HIPÓTESIS **10**

III.1. Hipótesis 10

IV. MATERIALES Y MÉTODOS **11**

IV.1. Enfoque de la investigación 11

IV.2. Tipo de investigación 11

IV.3. Diseño de investigación 11

IV.4. Procedimientos 11

IV.4.1. Obtención de muestras de ARN control 11

IV.4.2. Obtención del ADN complementario 11

IV.4.3. Aplicación de los protocolos de amplificación 12

IV.4.4. Obtención de muestras de hisopado nasofaríngeo de murciélagos 13

IV.4.5. Extracción de ARN 13

IV.4.6. Amplificación 13
IV.4.7. Construcción de bibliotecas 14
IV.4.8. Secuenciación 14
IV.5. Análisis de datos 14
IV.5.1. Análisis bioinformático 14
V. RESULTADOS 16
V.1. Aplicación de protocolos de amplificación 16
V.2. Extracción de ARN y amplificación 16
V.3. Análisis de datos 17
VI. DISCUSIÓN 23
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 29
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 30
IX. ANEXOS 38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de ADN viral en ocho muestras control.....16

Tabla 2. Concentraciones obtenidas luego de realizar las PCR correspondientes a las muestras de las que se obtuvo ARN 17

Tabla 3. Frecuencia relativa de reads de los virus seleccionados para secuenciar a partir de las muestras de PCR Pancov 20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Asignación taxonómica con Kraken de los coronavirus detectados en la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*) 18

Figura 2. Asignación taxonómica con Kraken de los coronavirus presentes en la muestra CHI21070 (*Barbastella barbastellus*) 19

Figura 3. Asignación taxonómica con Kraken de los coronavirus presentes en la muestra CHI21124 (*Myotis emarginatus*).....19

Figura 4. Posición de las muestras amplificadas con PCR Artic en el árbol filogenético de la colección de genomas de coronavirus de Europa de GISAID 22

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

Los coronavirus han sido responsables de eventos epidémicos previos a la pandemia de COVID-19, como los de SARS en 2003 y MERS en 2012 (Lefrançois et al., 2023), lo que resalta la importancia de un análisis continuo de su diversidad y potencial zoonótico. En ese sentido, el desarrollo de estrategias para monitorear la aparición de un agente patógeno con potencial para causar una pandemia resulta pertinente. A pesar de que existen propuestas para rastrear la propagación de enfermedades causadas por patógenos como los coronavirus, como los modelos matemáticos desarrollados por Delgado (2021), Álvarez Mora et al. (2021) y Cordoves y Severo (2022), la imprevisibilidad de los eventos hace que estos modelos tengan poco o nulo valor prospectivo. Por ello, resulta necesario estudiar el origen biológico de las mismas.

La reciente pandemia, ocasionada por el coronavirus SARS-CoV-2, evidenció la capacidad de ciertos coronavirus de cambiar de hospedero con éxito y de infectar al ser humano (Devaux et al., 2023). Por ende, estudios sobre especies hospederas de estos virus realizados en la última década cobraron mayor relevancia. Tal como expuso Balkema et al. (2021) en su estudio sobre la presencia de coronavirus en murciélagos, estos mamíferos son importantes reservorios de coronavirus y han de ser considerados como potencial fuente de zoonosis hacia el ser humano, en particular aquellas especies que suelen habitar las urbes o forman parte de la gastronomía de ciertas regiones del mundo. Como este, otras investigaciones han reportado sendas especies de murciélagos en los que abunda gran diversidad de coronavirus (Hardmeier et al., 2021), los cuales, a partir de la última pandemia, han sido puntos de partida para llevar a cabo estudios de caracterización de estos virus en murciélagos y otros vertebrados (Lee et al., 2021). En este ámbito, el término caracterización engloba al conjunto de métodos utilizados para detectar, identificar y clasificar los virus presentes en una muestra, tales como la amplificación y análisis del genoma viral o de una región en particular (Scrima et al., 2022). En este contexto, la caracterización de coronavirus en murciélagos de distintas regiones no solo se ha convertido en un tema de interés en el ámbito sanitario, sino que constituye una importante herramienta para la salud pública, al ser capaz de mostrar las similitudes entre los coronavirus de dichos mamíferos y los que afectan al ser humano (Streicker et al., 2020).

El presente estudio ofrece información sobre la diversidad de coronavirus en murciélagos de Cataluña. Se ha logrado determinar la cercanía filogenética de los coronavirus detectados con aquellos que son patógenos para el ser humano, lo que resalta la importancia de la investigación en la evaluación del riesgo de transmisión zoonótica en esta área geográfica.

I.2. Descripción de la realidad problemática

Diversas investigaciones han dilucidado la capacidad de los coronavirus de transmitirse a humanos a partir de un reservorio animal (Ge et al., 2013; Hu et al., 2017; Morens et al., 2020). En ese sentido, varios estudios enfocados en fauna asiática y de Medio Oriente indican que el SARS-CoV puede transmitirse desde murciélagos a humanos mediante un hospedero intermediario que probablemente es *Paradoxurus hermaphroditus* (Pallas, 1777*)* (Frutos et al., 2020; Zhou & Shi, 2021); mientras que los intermediarios del MERS-CoV podrían ser los camélidos. Con respecto al SARS-CoV-2, se ha propuesto a *Manis javanica* (Desmarest, 1822) como posible intermediario, además de *Paradoxurus hermaphroditus* (Pallas, 1777) y diversas especies de serpientes (Cortés, 2020; Lam et al., 2020). Sin embargo, la información sobre los hospederos de estos virus en la fauna de la región de Cataluña aún es escasa; empero, los murciélagos de esta zona resaltan como principales candidatos para ser reservorios de coronavirus, pues sendos estudios sugieren que dichos mamíferos son reservorios de una amplia gama de Betacoronavirus tipo coronavirus SARS (Zhou et al., 2020; Moraga-Fernández et al., 2022).

I.3. Definición del problema

En base a lo mencionado anteriormente, surge la necesidad de determinar la diversidad de las especies de coronavirus presentes en murciélagos, pues, tal como indica la Generalidad de Cataluña (2023), en dicha región habitan 30 especies de murciélagos, que representan el 90% de las especies de murciélagos que habitan la península Ibérica; además de representar la tercera parte de los mamíferos terrestres de la región. Asimismo, en la región habitan especies como *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774) y *Rhinolophus hipposideros* (Bechstein, 1800), las cuales, en diferentes regiones del mundo, han demostrado ser reservorios de coronavirus con un genoma bastante semejante a los SARS CoV, como Khosta-1, llegando a tener hasta 96% de similitud en algunos casos (Luk, 2019; Cortés, 2020; Alkhovsky, 2022). La similitud genómica podría ser una evidencia de cercanía filogenética entre los coronavirus presentes en los murciélagos y los que afectan al ser humano, representando una posible amenaza contra la salud pública. En ese sentido, se buscó resolver

el problema mediante la pregunta: ¿qué coronavirus se encuentran en murciélagos de Cataluña y en qué medida se encuentran relacionados filogenéticamente con el SARS-CoV-2? Cabe resaltar que la presente investigación fue exploratoria, por lo que se buscó describir los resultados obtenidos, mas no realizar un análisis filogenético a profundidad ni estudiar la diversidad de los coronavirus a detalle. El presente estudio solo se enfocó en identificar qué coronavirus semejantes al SARS-CoV-2 estaban presentes en los murciélagos en el marco de la emergencia sanitaria producida por dicho virus.

I.4. Objetivos

Objetivo general:

Identificar los coronavirus presentes en muestras de epitelio nasofaríngeo de especies de murciélagos de Cataluña, España, y explorar de forma preliminar sus relaciones filogenéticas con el SARS-CoV-2.

Objetivos específicos:

- Identificar los coronavirus presentes en murciélagos de Cataluña.
- Inferir de forma preliminar las relaciones filogenéticas de los coronavirus presentes en murciélagos de Cataluña en relación con variantes de SARS-CoV-2.

I.5. Justificación e importancia de la investigación

La pandemia de COVID-19, provocada por el SARS-CoV-2, ha evidenciado el significativo impacto que pueden tener las zoonosis en la salud pública global. La caracterización de las variantes de coronavirus que circulan en posibles hospedadores es fundamental para comprender la emergencia de nuevos patógenos con potencial para infectar al ser humano (Cortés, 2020). La presente investigación se justifica en la necesidad de generar información valiosa sobre la diversidad genética de los coronavirus presentes en murciélagos de la región de Cataluña, España. A través de técnicas de metabarcoding, combinadas con tecnologías de secuenciación de siguiente generación y análisis bioinformático, se busca aportar información relevante para el ámbito de la identificación de coronavirus con potencial zoonótico. Esta información es crucial para anticipar y mitigar el riesgo de futuras infecciones zoonóticas que puedan representar una amenaza para la salud pública.

I.6. Limitaciones de la investigación

Este estudio se encontró limitado por el desconocimiento de la ubicación exacta y condiciones de muestreo y almacenamiento de muestras, así como por la cantidad de muestras en las que se pudo amplificar material genético viral.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

Las enfermedades infecciosas causadas por virus representan un gran problema de salud pública mundial, causando miles de muertes anualmente (Robb et al., 2019). Estos pueden ser de distintos tipos, siendo uno de ellos los coronavirus. Los virus mencionados son un género de la familia Coronaviridae, son pleomórficos de ARN monocatenario, con una nucleocápside helicoidal, envuelta por una membrana que contiene la glicoproteína transmembrana (M), la glicoproteína espiga (S) y la proteína de envoltura (E). Se dividen en tres grupos, que a su vez se subdividen en subgrupos, basándose inicialmente en análisis serológicos y en análisis genéticos (Perlman et al., 2009).

El estudio a nivel molecular de virus de interés clínico puede iniciar con la amplificación de su genoma mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica con la que se pueden obtener millones de copias de una secuencia nucleotídica (amplicones) en poco tiempo (Jiménez et al., 2021). Asimismo, durante la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2, la PCR tomó gran importancia para su diagnóstico a nivel molecular.

Para continuar con el análisis, luego de obtener una concentración aceptable de amplicones, se puede proceder a secuenciar el fragmento genético amplificado. A diferencia de la secuenciación mediante la tecnología de Illumina (la cual genera resultados de uno a tres días y cuyos datos no se pueden aplicar para un análisis posterior hasta completar la secuenciación), la tecnología de Oxford Nanopore detecta directamente cambios en las corrientes generadas cuando las moléculas de ADN/ARN pasan a través de una proteína acoplada a nanoporos, con una velocidad de aproximadamente 450 bases por segundo para el ADN y 80 bases por segundo para ARN (Deamer et al., 2016). Por ende, la secuenciación se realiza en tiempo real y los datos pueden utilizarse de forma inmediata.

Las secuencias obtenidas suelen ser analizadas posteriormente mediante técnicas de bioinformática, un área multidisciplinaria que se basa en la aplicación de herramientas computacionales para la recopilación e interpretación de datos biológicos. El conocimiento obtenido a partir de estos datos de secuencia es fundamental para la comprensión de la biología, particularmente, para desarrollar investigaciones de genómica y proteómica

comparativa, haciendo posible conocer la ubicación y funciones de los genes, estructura y función de proteínas, etc. (Bayat, 2002).

Si bien existen estudios que han aplicado estas metodologías para investigar la diversidad de coronavirus en murciélagos de diferentes zonas geográficas del mundo, incluso utilizando muestras de países de la Unión Europea y de la península Ibérica (European Food Safety Authority, 2021; Moraga-Fernández et al., 2022), existe un vacío importante referente a la caracterización de estos virus en regiones específicas de cada país, particularmente en España. Por ello, los resultados de esta investigación representan un aporte para subsanar dicho vacío de información.

II.2. Antecedentes del estudio

Los coronavirus tomaron prominencia durante los brotes del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) de 2002-2003 (Peiris et al., 2004), siendo el más reciente y de mayor relevancia el SARS-CoV-2, un nuevo coronavirus identificado a finales de 2019 en hospitales locales de Wuhan, provincia de Hubei, China; utilizando un mecanismo de vigilancia para la neumonía de etiología desconocida, establecido a raíz del brote de SARS de 2003 (Zhu et al., 2019). En ese sentido, el 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud declaró que COVID-19 (enfermedad producida por el SARS-CoV-2) es una emergencia de salud pública de interés internacional (Li et al., 2020).

Bajo esta perspectiva, se han realizado estudios basados en la caracterización de la diversidad de coronavirus en murciélagos en búsqueda de virus semejantes al SARS-CoV-2, tal como el realizado por Delaune et al. (2021) en Camboya, en el que, de 430 muestras de seis familias de murciélagos y dos familias de mamíferos carnívoros (con 162 muestras de hisopado oral y 268 de rectal), solo 16 lograron amplificar secuencias de coronavirus mediante la PCR Pancov, de las cuales 11 pertenecieron al género *Alphacoronavirus* y cinco al *Betacoronavirus*. De estos últimos, dos pertenecieron al subgénero *Sarbecovirus*, que contiene especies de virus tipo SARS-CoV. Otro estudio similar es el realizado por Yadav et al. (2020), en el cual se colectaron 586 muestras de hisopado orofaríngeo y rectal de dos especies de murciélagos a lo largo de varias provincias de la India. En este caso, mediante una RT-PCR con cebadores para amplificar el gen RdPd, se hallaron secuencias de coronavirus BtRt-BetaCoV/GX2018 y BtCoV HKU9-1. Así también, los resultados de la investigación realizada por Ip et al. (2021) en EE.UU., utilizando muestras provenientes de

mamíferos de Utah sometidas a PCR Pancov, mostraron que 72 roedores tenían dos especies de *Alphacoronavirus* y 14 de *Betacoronavirus*; mientras que 73 visones tenían 123 especies de *Alphacoronavirus* y 74 de *Betacoronavirus*.

El estudio realizado por Hu et al. (2018), se basó en la caracterización de coronavirus de una muestra de 334 murciélagos de la ciudad de Zhoushan, provincia de Zhejiang, China. En dicho caso, se utilizaron cebadores degenerados para la PCR, con el objetivo de obtener secuencias genómicas completas de coronavirus. Los productos se purificaron en gel y se sometieron directamente a la secuenciación. En dicha investigación, se amplificó la secuencia de la proteína coronaviral RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN), detectando coronavirus en el 26,65% de los murciélagos, proporción influenciada por los cambios estacionales. Adicionalmente, se encontraron dos variantes de coronavirus similares al SARS-CoV-1 (virus causante del gran brote de SARS en el sudeste asiático en 2003), es decir, con posible patogenicidad para el ser humano. Las nuevas variantes se denominaron ZXC21 y ZC45, y su genoma mostró una longitud de 29732 y 29802 nucleótidos, respectivamente; representando una identidad compartida del 81% con el SARS-CoV-1, siendo más distantes que otros coronavirus similares al SARS-CoV-1 reportados en China previamente. Para determinar su infectividad, se infectaron ratas lactantes, en las que el virus fue capaz de replicarse y producir enfermedad. Además, estudios posteriores reportaron partículas similares a virus en los cerebros de este modelo animal mediante microscopía electrónica. Por ende, dicha investigación incrementó el conocimiento sobre la diversidad genética de los coronavirus similares a SARS-CoV-1 presentes en los murciélagos, además de dar luces de la posibilidad de transmisión entre especies.

Por otro lado, Pater et al. (2021), indican que diversas investigaciones han demostrado la capacidad de secuenciar el SARS-CoV-2 mediante la secuenciación de nanoporos con alta precisión y alta sensibilidad para detectar polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Dicho grupo de investigación adoptó y modificó protocolos desarrollados inicialmente por ARTIC Network para secuenciar los genomas virales del SARS-CoV-2 utilizando la plataforma de secuenciación MinION de Oxford Nanopore. El proyecto Artic Network contiene un protocolo de análisis bioinformático específico para procesar el output generado por la secuenciación con la tecnología de Oxford Nanopore de virus SARS-CoV-2 (protocolo en: https://artic.network/ncov-2019/ncov2019-bioinformatics-sop.html), mostrando que la

aplicación de herramientas bioinformáticas para estudios relacionados con este virus está ampliamente difundida.

En conjunto, estos estudios subrayan la necesidad de investigar más a fondo qué coronavirus están presentes en murciélagos, especialmente en regiones como Cataluña, donde la identificación de los mismos es aún escasa.

II.3. Bases teóricas

De los patógenos conocidos para el ser humano, al menos 700 tienen su origen en animales vertebrados, transmitiéndose mediante zoonosis (Deng et al., 2024). Algunos de estos son coronavirus, presentes en muchos animales silvestres y domésticos. Cada vez que dichos virus infectan una célula, se libera una ingente cantidad de copias de los mismos, acumulando mutaciones al azar. La frecuencia con la que se acumulan las mutaciones se denomina tasa de mutación viral, y es de utilidad para rastrear la expansión del virus. A partir de ello, fue posible determinar que el origen del SARS-CoV-2 ocurrió probablemente en murciélagos y que de allí se haya transmitido al ser humano a través de mutaciones o recombinaciones sufridas en un hospedador intermedio, posiblemente un mamífero del mercado de Wuhan, China. Con respecto a este virus, posee un genoma de ARN de aproximadamente 30 000 pares de bases, con dos regiones no traducidas de 265 y 229 nucleótidos. Su genoma se traduce en la poliproteína pp1a y pp1b, que genera 16 proteínas no estructurales que forman un complejo de replicación y transcripción. Este virus produce tres factores de virulencia responsables de su diseminación e inhibición del sistema inmunitario (Valenzuela, 2020).

Por otro lado, el análisis filogenético es aquel utilizado para inferir o estimar relaciones evolutivas entre organismos. Los datos en este campo suelen consistir en alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y el desarrollo de árboles filogenétios, obtenidos mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas; tal como el procedimiento llevado a cabo por Hu et al. (2018), en el que se ensamblaron amplicones de coronavirus para obtener secuencias de genoma completo y poder alinearlas con sus vecinos filogenéticos más cercanos en la base de datos GenBank, usando el software CLUSTAL W v.2.0. Así también, se construyeron árboles filogenéticos basados en secuencias de nucleótidos utilizando el software MEGA v.7 con el modelo de máxima verosimilitud compuesta y un valor de arranque de 1000.

Como expone Griffiths (2020), existe variedad de métodos para realizar alineamientos múltiples además del uso de CLUSTAL W, como PileUp y ALIGN en ProPack. Bajo esta perspectiva, se observa que la metodología para caracterización y análisis filogenético de virus se encuentra disponible en la literatura, la cual sirve de soporte para la identificación *in silico* de secuencias similares a las del SARS-CoV-2.

II.4. Definición de categorías de análisis

- Variantes de coronavirus: Se refiere a las versiones del virus que tienen mutaciones genéticas significativas. La evolución de los virus, incluyendo los coronavirus y el SARS-CoV-2, es constante y se debe en gran medida a los cambios producidos en su código genético durante la replicación. Algunas de estas mutaciones pueden dar lugar a variantes que son diferentes del virus original, siendo más transmisibles o aumentando la gravedad de la enfermedad (Zhou et al., 2021).
- Aplicación de metodologías: En la presente investigación, se aplicaron técnicas de amplificación genómica mediante PCR y de secuenciación. Con ello, se aseguró que los métodos utilizados sean robustos, reproducibles y adecuados para el análisis de las muestras (Montes-Guerra, 2013).
- Relaciones filogenéticas: Son las conexiones evolutivas entre diferentes organismos (Hu et al., 2018). Para inferirlas en la presente investigación, fue necesaria la construcción de un árbol filogenético basado en las secuencias de SNPs del gen de la proteína viral RdPd.
- Comparación genómica: Basada en la comparación de las secuencias genómicas mediante herramientas bioinformáticas para identificar similitudes y diferencias. En este caso, se analizaron las secuencias de SNPs de los coronavirus identificados. Con ello, se buscó identificar alguna característica genómica de los coronavirus de murciélagos que pueda estar asociada con el SARS-CoV-2.

III. HIPÓTESIS

III.1. Hipótesis

Los murciélagos de Cataluña presentan diferentes coronavirus, algunos de los cuales están filogenéticamente relacionados a coronavirus como el SARS-CoV-2.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Enfoque de la investigación

La presente investigación tiene un enfoque cualitativo, puesto que se basa en la caracterización de variantes de coronavirus, además de presentar una hipótesis inductiva (Pimienta et al., 2017).

IV.2. Tipo de investigación

Asimismo, es de tipo descriptiva, ya que el objetivo general es identificar las características de un grupo sometido a análisis, en este caso, los coronavirus presentes en murciélagos de Cataluña (Hernández et al., 2014).

IV.3. Diseño de investigación

Este estudio puede considerarse de diseño mixto. En principio, al enfocarse en la caracterización de variantes virales y no manipular las variables, se considera no experimental. No obstante, la aplicación de protocolos de amplificación de secuencias le otorga el carácter experimental (Hernández et al., 2014).

IV.4. Procedimientos

IV.4.1. Obtención de muestras de ARN control

Se utilizaron ocho muestras de ARN purificado de distintos virus respiratorios como control positivo. Las muestras de ARN previamente extraído fueron proporcionadas por el laboratorio de Patógenos Humanos de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona, con autorización previa. Es importante señalar que no se dispone de información detallada sobre el método específico utilizado para la extracción de ARN en estas muestras.

IV.4.2. Obtención del ADN complementario

Como primer paso, se obtuvo ADN complementario (ADNc) de las muestras control mencionadas utilizando el kit de retrotranscripción SuperScript III-Invitrogen y siguiendo el protocolo del fabricante con ciertas modificaciones (Anexo 1). Primero, se preparó el mix de la reacción agregando 1 µL de hexámeros random (50 µM, Invitrogen) a un tubo de 0.2 mL, 1 µL de 10 mM dNTPs (New England Biolabs) y 11 µL de muestra de ARN de cada tubo. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador MWG Biotech Inc Primus

96, incubando los tubos a 65 °C por 5 min, luego se colocaron en hielo por 1 min, se centrifugaron a 1500 rpm por 20 segundos empleando una centrífuga Hermle Z233 M-2. Después, en cada tubo se agregó 4 µL de 5X first strand buffer, 1 µL de 0.1 M de DTT, 1 µL de RNAsa OUT (Invitrogen), 1 µL de la enzima SuperScript III RT (200 U/µL) y se mezcló por pipeteo. A continuación, los tubos se incubaron a 25 °C por 5 min, luego a 50 °C por 60 min y finalmente a 70 °C por 15 min. Finalmente, para detener la reacción, se agregó 1 µL de RNAsa H (Invitrogen) y se incubó a 37 °C por 20 min. Luego, los productos fueron almacenados a -20 °C para su posterior uso.

IV.4.3. Aplicación de los protocolos de amplificación

Posteriormente, se corrieron dos PCRs por separado:

- PCR RespiCoV para amplificar el genoma de todos los virus respiratorios utilizados como control (Anexo 2). Para ello, se agregó 3 µL de ADNc, 13 µL de la enzima LongAmp (New England Biolabs), 1.6 µL de cebadores (Invitrogen) de 10 µM, a partir de un tubo con los cebadores forward y reverse en solución cuyo diseño se obtuvo a partir de estudio de Brinkman et al. (2022); y 7.4 µL de agua para biología molecular a un tubo de 2 mL. Este procedimiento se realizó para cada muestra de ADNc. Posteriormente, en el termociclador utilizado anteriormente, se colocaron los tubos preparados bajo el siguiente programa: 94 °C durante 5 min, 45 ciclos de amplificación a 94 °C durante 20 s, 65 °C durante 30 s, 72 °C durante 20 s y un paso de extensión final durante 5 min a 72 °C (Brinkmann et al., 2022).

- PCR ARTIC para amplificar el genoma completo de SARS-CoV-2, presente en una de las muestras control. Este procedimiento se basó en dos reacciones: La reacción 1 se llevó a cabo agregando 12.5 µL de la enzima LongAmp, 4 µL de Pool 1 de cebadores (10 µM), 6 µL de agua para biología molecular y 2.5 µL de ADNc; todo en un tubo de 0.2 mL y haciendo el mismo proceso para cada muestra. La reacción 2 se compuso de 12.5 µL de la enzima LongAmp, 4 µL de Pool 2 de cebadores (10 µM), 6 µL de agua para biología molecular y 2.5 µL de ADNc de la misma muestra usada anteriormente; todo en un tubo de 0.2 mL para cada muestra. Se colocaron los tubos de ambas reacciones en el termociclador y el programa fue: 1 ciclo de 98 °C por 30 s, seguido de 25 ciclos de 98 °C por 30 s y 65 °C por 5 min, 15 ciclos de 62.5 °C por 5 min y 98 °C por 15 s, 1 ciclo de 62.5 °C por 5 min y mantenido a 4 °C por

un máximo de 12 horas (Lambisia, 2022). Luego, los productos fueron almacenados a -20 °C para su posterior uso.

IV.4.4. Obtención de muestras de hisopado nasofaríngeo de murciélagos

Como grupo experimental, se utilizaron muestras de hisopado nasofaríngeo de murciélagos de distintas localidades de Cataluña, España. El laboratorio de Patógenos Humanos de la facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona contaba con 210 muestras, de las cuales las 100 primeras fueron utilizadas en esta investigación (Anexo 2), con previa autorización. No fue necesaria ninguna autorización adicional, ya que no se trabajó directamente con fauna silvestre, sino con muestras previamente donadas a dicho laboratorio por la Facultad de Veterinaria de la misma universidad. La colecta y obtención de permisos fue realizado en la Facultad de Veterinaria, por lo que no se tiene información sobre las condiciones de almacenamiento. Asimismo, lo mencionado escapa a los objetivos del presente estudio, por lo que no representó un inconveniente.

De las muestras utilizadas, cinco pertenecieron a *Barbastella barbastellus* (Schreber, 1774), una a *Eptesicus serotinus* (Schreber, 1774), 22 a *Myotis bechteinii* (Kuhl, 1817), dos a *Myotis crypticus* (Ruedi, 2019), una a *Myotis daubentonii* (Kuhl, 1817), cinco a *Myotis emarginatus* (Geoffroy, 1806), dos a *Myotis escalerai* (Cabrera, 1904), ocho a *Nyctalus leisleri* (Kuhl, 1817), 19 a *Pipistrellus kuhlii* (Kuhl, 1817), 21 a *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774), cinco a *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825), una a *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758), seis a *Plecotus austriacus* (Fischer, 1829), una a *Rhinolophus ferrumequinum* y una a *Rhinolophus hypposideros*.

IV.4.5. Extracción de ARN

El ARN de las muestras de hisopado nasofaríngeo fue extraído mediante el Kit de extracción de RNA total Sigma-Aldrich y siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 3). La cuantificación se realizó con un fluorímetro Qubit (Anexo 4). Para obtener el ADNc, se siguió con el protocolo expuesto en el punto IV.4.2.

IV.4.6. Amplificación

Los protocolos de amplificación, incluyendo las secuencias de los cebadores, se encuentran en el Anexo 5. Las muestras de las que se obtuvo ADNc se sometieron a tres PCR: (1) PCR pan-CoV (Holbrook, 2021), la cual se utiliza para amplificar la secuencia del gen RdRp

presente en todo tipo de coronavirus. Este procedimiento incluyó dos PCR consecutivas (Anexo 5). Para la primera PCR, se agregaron 3 µL de ADNc, 13 µL de la enzima LongAmp, 2.5 µL de cebadores forward (0.4 µM), 2.5 µL de cebadores reverse (0.4 µM) y 4 µL de agua para biología molecular a un tubo de 0.2 mL. El programa para esta PCR fue: 94 °C durante 3 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, 48 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Para la segunda PCR, se agregó 1 µL del producto de la primera PCR, 13 µL de la enzima LongAmp, 1 µL de cebadores forward (0.4 µM), 1 µL de cebadores reverse (0.4 µM) y 9 µL de agua para biología molecular a un tubo de 0.2 mL. El programa para esta PCR fue: 94 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min. (2) PCR Artic (ARTIC Network, s.f.), para amplificar el genoma completo de los virus SARS-CoV-2 que puedan estar en las muestras. (3) PCR RespiCoV (Brinkmann et al., 2022) para la identificación simultánea de virus respiratorios, como los de las familias Adenoviridae, Coronaviridae, Hantaviridae, Orthomyxoviridae y Pneumoviridae, mediante la amplificación de regiones específicas de sus genomas.

IV.4.7. Construcción de bibliotecas

Los amplicones obtenidos fueron purificados usando perlas magnéticas (AMPure XP bead Sigma Aldrich) para eliminar residuos de los reactivos (dNTP, sales, cebadores, dímeros de cebadores). Mediante el kit de Rapid Barcoding (Oxford Nanopore technologies, 2022), se añadió código de barras y la proteína de unión al nanoporo siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 6).

IV.4.8. Secuenciación

La secuenciación se realizó siguiendo el protocolo Rapid Barcoding Sequencing (Anexo 6), en un secuenciador MinIon de Oxford Nanopore (Oxford Nanopore technologies, 2022), para lo cual se hizo un lavado previo de la celda de flujo y se utilizó 11 ng de cada una de las bibliotecas en cada ronda secuenciación.

IV.5. Análisis de datos

IV.5.1. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de las secuencias se llevó a cabo con los datos generados por el software del secuenciador. Luego de secuenciar los amplicones generados por la PCR Pancov,

los reads fueron procesados mediante el software NanoFilt (De Coster, 2017) y Porechop (Wick, 2018) para el control de calidad (Q>10) y longitud de secuencia (< 500 pb). La diversidad de coronavirus se abordó con un alineamiento taxonómico mediante la herramienta informática Kraken2. Finalmente, el análisis y visualización de los datos fue posible con el uso de Pavian metagenomics data explorer (Breitwieser et al., 2020). Puesto que los cebadores utilizados en la PCR Artic amplifican diferentes regiones a lo largo de todo el genoma, para analizar los datos obtenidos a partir de esta PCR se siguieron los siguientes pasos:

- Ensamble por referencia basado en mapeo: Las herramientas para llevar a cabo este procedimiento se encuentran en el protocolo de análisis bioinformático de acceso público de Artic Networks (https://artic.network/ncov-2019/ncov2019-bioinformatics-sop.html) y se basó en el alineamiento de cada read con el genoma de referencia del SARS-CoV-2. Dicha herramienta se encarga de corregir los errores de secuenciación en los amplicones, además del ensamblado de los amplicones que se solapan entre sí, con el objetivo de formar contigs y luego una secuencia consenso. Cuando el software no detectó la presencia de un amplicón entre dos contigs, se interpretó como un gap, es decir, no se obtuvo una secuencia consenso, sino una serie de contigs como output.

- Análisis filogenético: Utilizando los contigs obtenidos y secuencias de la colección de genomas de coronavirus de Europa disponible en la base de datos GISAID (Khare, 2021), mediante el software Parsnp (Treangen et al., 2014), se obtuvieron secuencias de SNPs propias de las muestras analizadas y de cada genoma de dicha colección, con las cuales se hizo un alineamiento múltiple usando el mismo software. Cabe destacar que todas las secuencias alineadas tuvieron la misma longitud. Mediante el software RAXML (Stamatakis, 2014), se construyó un árbol filogenético con un enraizamiento por punto medio, debido a que en el análisis no se incluyó un grupo externo. Se usaron los datos del alineamiento obtenidos anteriormente como input y el modelo evolutivo GTR, ya que permite tasas de sustitución diferentes para cada par de nucleótidos, no asume frecuencias iguales de bases y es bastante adecuado para genomas virales, donde las tasas de mutación pueden variar entre sitios y tipos de sustitución (Wadas et al., 2025). RAXML realiza un bootstraping de 1000 para obtener el mejor árbol filogenético posible, el cual fue visualizado usando iTOL (Letunic et al., 2024).

V. RESULTADOS

V.1. Aplicación de protocolos de amplificación

Al llevar a cabo la aplicación de los protocolos de amplificación con las muestras control se obtuvieron concentraciones de ADN entre 0.6 ng/µL y 11.4 ng/µ, mediante el uso de Qubit (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de ADN viral en ocho muestras control

Virus de la muestra	Concentración de amplicones generados por PCR RespiCoV (ng/µL)	Concentración de amplicones generados por PCR Artic (ng/µL)
Rino-enterovirus para influenza 3	0.66	-
SARS-CoV-2	0.15	1.4
SARS-CoV-2	1.16	-
Metapneumovirus	0.51	-
Rino-enterovirus	0.45	-
Adenovirus	11.4	-
Metapneumovirus	1.1	-
Rino-enterovirus	0.6	-

Todos los virus utilizados forman parte del panel de virus de la PCR RespiCov. Sin embargo, se observó que esta PCR amplificó la secuencia de Adenovirus principalmente (> 10 ng/µL), además de secuencias de Metapneumovirus y SARS-CoV-2 en menor proporción (entre 1 y 1.5 ng/µL); mientras que las secuencias de Rino-enterovirus y una de SARS-CoV-2 tuvieron concentraciones menores a 1 ng/µL. Por otro lado, la única muestra que amplificó mediante la PCR Artic fue una de SARS-CoV-2, con una concentración, mayor a 1 ng/µL. Con esto, se pudo confirmar que la PCR Artic fue capaz de amplificar secuencias específicas de SARS-CoV-2.

V.2. Extracción de ARN y amplificación

Posteriormente, de las 100 muestras de epitelio nasofaríngeo de murciélagos obtenidas mediante hisopado de las que se extrajo ARN, solo ocho mostraron concentración en la lectura del Qubit (Anexo 7). En consecuencia, las 92 restantes se descartaron al no obtener ARN, por lo que no se continuó utilizándolas en este estudio. Luego se realizó la retrotranscripción de

las ocho muestras con concentración de ARN para obtener el ADNc y poder correr la PCR Artic, PCR RespiCoV y PCR Pancov (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones obtenidas luego de realizar las PCR correspondientes a las muestras de las que se obtuvo ARN

Especie de murciélago	Código original de la muestra	Concentración de amplicones generados (ng/µL)		
		PCR Artic	PCR RespiCoV	PCR Pancov
Barbastella barbastellus	CHI21070*	1.04	0.35	1.71
Myotis bechsteinii	CHI21029	0	0.1	0.29
Myotis bechsteinii	CHI21030	0.06	0.1	0.61
Myotis bechsteinii	CHI21032*	1.59	0.1	0.53
Myotis bechsteinii	CHI21034	0	0	0.47
Myotis bechsteinii	CHI21035*	0.22	0.18	1.16
Myotis emarginatus	CHI21124*	0.1	0.2	30.1
Pipistrellus kuhlii	CHI21104	0.22	0	0.55

*Muestras seleccionadas para secuenciar

V.3. Análisis de datos

En primer lugar, se analizaron los datos de secuenciación de las muestras que fueron sometidas a la PCR Pancov (Anexo 8). La muestra CHI21070 (*Barbastella barbastellus*) presentó un mayor número de reads de la secuencia RdRp propia de los coronavirus. Asimismo, se obtuvieron gráficos que muestran las relaciones filogenéticas entre los diferentes tipos de coronavirus detectados en cada muestra. En la Figura 1 se observa que la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*) presenta cinco especies diferentes de coronavirus (Alphacoronavirus 1, Bat coronavirus, Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus y Shrew coronavirus) pertenecientes a los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus,* siendo el Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008 el más abundante, información que se corrobora en la Tabla 3.

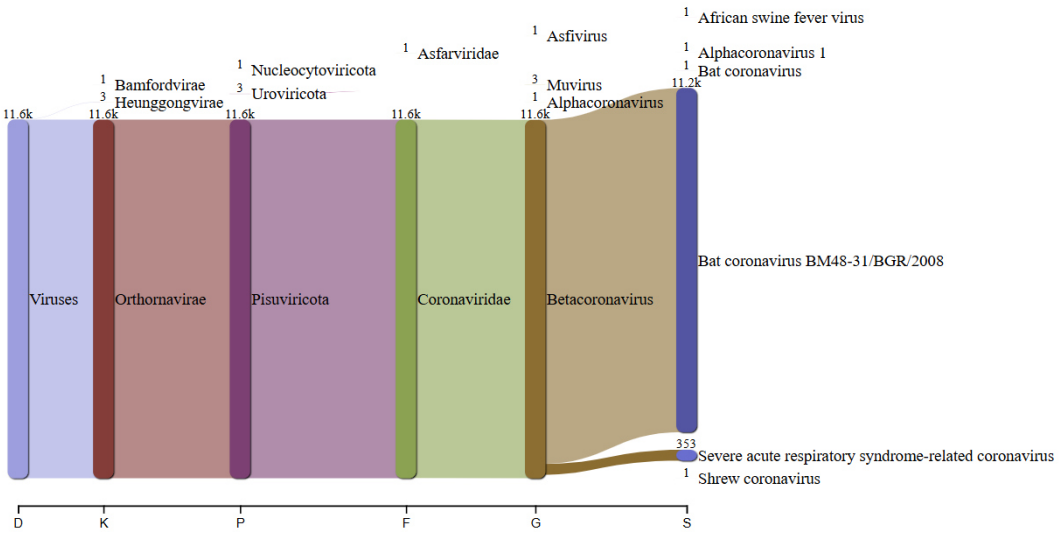

Figura 1. Asignación taxonómica con Kraken de los coronavirus detectados en la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*)

En la Figura 2 se visualiza que la muestra CHI21070 (*Barbastella barbastellus*) presenta seis especies diferentes de coronavirus (Ferret coronavirus, *Rinolophus ferrumequinum* alphacoronavirus HuB-2013, Rousettus bat coronavirus HKU9, Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus y Avian coronavirus) pertenecientes a los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* y *Gammacoronavirus,* siendo el Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus el más abundante, lo cual puede observarse en la Tabla 3.

En la Figura 3 se aprecia que la muestra CHI21124 (*Myotis emarginatus*) hay nueve especies diferentes de coronavirus (Bat coronavirus HKU10, Coronavirus AcCoV-JC34, Human coronavirus 229E, Human coronavirus NL63, Miniopterus bat coronavirus HKU8, *Myotis ricketti* alphacoronavirus Sax-2011, NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-9b, Scotophilus bat coronavirus 512 y Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008) pertenecientes a los géneros Alphacoronavirus y Betacoronavirus, siendo el Human coronavirus 229E el más abundante, tal como se indica en la Tabla 3.

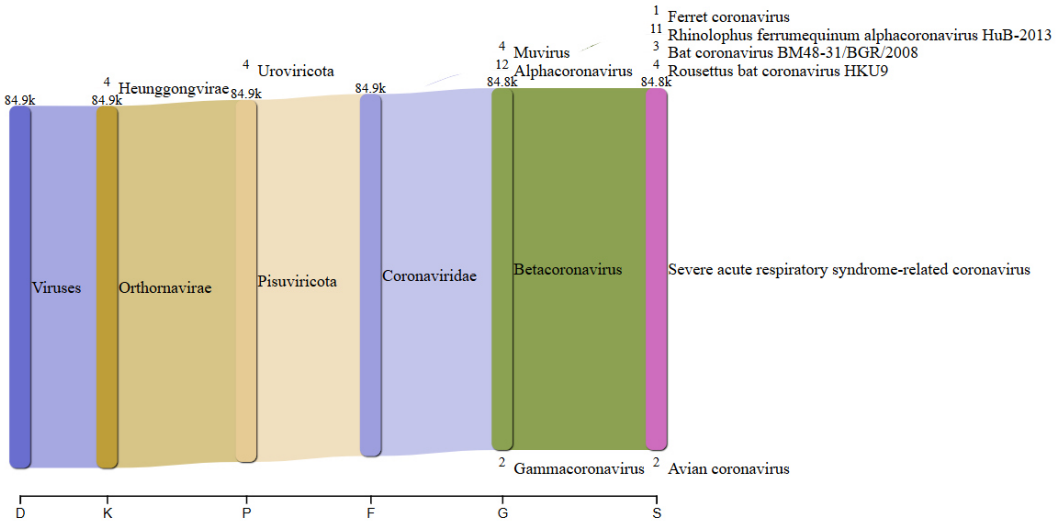

Figura 2. Asignación taxonómica con Kraken de los coronavirus presentes en la muestra CHI21070 (*Barbastella barbastellus*)

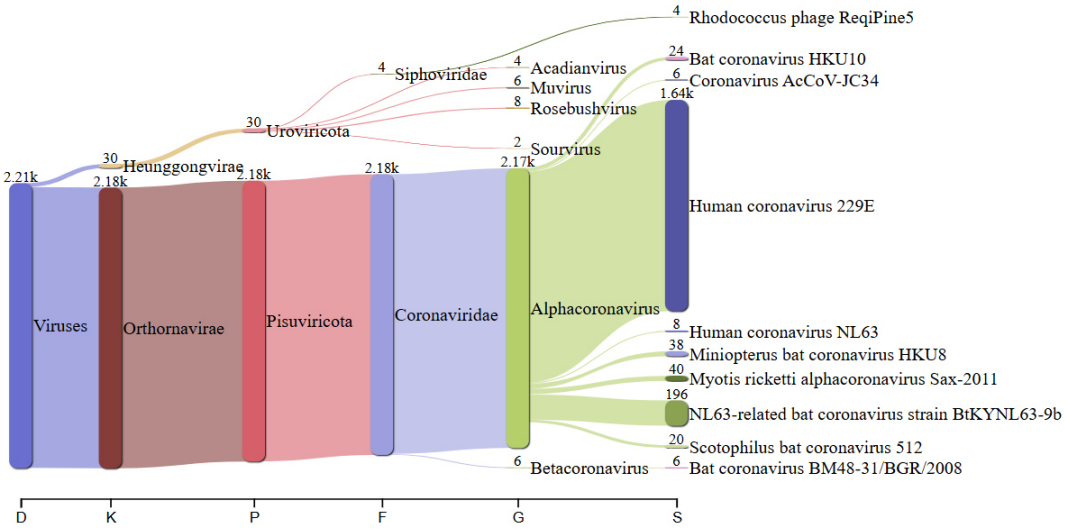

Figura 3. Asignación taxonómica con Kraken de los coronavirus presentes en la muestra CHI21124 (*Myotis emarginatus*)

Al secuenciar los amplicones de la PCR Pancov, se observa la presencia de 18 coronavirus diferentes en las tres muestras analizadas, además de cuatro virus de familias diferentes a Coronaviridae. Así también, el coronavirus con mayor concentración, en comparación con las otras muestras, fue el SARS-CoV, cuyos reads representaron el 99.98% de los obtenidos para

la muestra CHI21070 (*Barbastella barbastellus*). Por otro lado, el Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008, en la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*), fue el segundo con mayor concentración, mostrando un 96.9%; seguido del Human coronavirus 229E en la muestra CHI21124 (*Myotis emarginatus*), con 82.13% (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de reads de los virus seleccionados para secuenciar a partir de las muestras de PCR Pancov

Nombre del virus	taxID*	Muestra		
		CHI21124 (*Myotis emarginatus*) (%)	CHI21035 (*Myotis bechsteinii*) (%)	CHI21070 *(Barbastella barbastellus)* (%)
Human coronavirus 229E	11137	82.13	-	-
NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-9b	2501929	9.839	-	-
Human coronavirus NL63	277944	0.402	-	-
Myotis ricketti Alphacoronavirus Sax-2011	2501927	2.008	-	-
Miniopterus bat coronavirus HKU8	694001	1.908	-	-
Bat coronavirus HKU10	1244203	1.205	-	-
Scotophilus bat coronavirus 512	693999	1.004	-	-
Coronavirus AcCoV-JC34	1964806	0.301	-	-
Alphacoronavirus 1	693997	0.201	0.009	-
Wencheng Sm shrew coronavirus	1508228	0.1	-	-
Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008	864596	0.301	96.9	0.004
Shrew coronavirus	2050019	0.1	0.1	0.009
Acadianvirus reprobate	1982903	0.201	-	-
Rhodococcus phage ReqiPine5	691963	0.201	-	-
Sourvirus sour	2560509	0.1	-	-
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV)	694009	-	3.065	99.98
Bat coronavirus	1508220	-	0.009	-
African swine fever virus	10497	0.009	-	0.009
Rousettus bat coronavirus HKU9	694006	-	-	0.005
Rhinolophus ferrumequinum Alphacoronavirus HuB-2013	2501926	-	-	0.013
Ferret coronavirus	1264898	-	-	0.001
Avian coronavirus	694014	-	-	0.002

*Identificador de taxonomía depositado en la base de datos de taxonomía del NCBI. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi

Por otro lado, al llevar a cabo la metodología de análisis para los amplicones obtenidos por la PCR Artic, se observó que la cantidad de contigs generados para cada muestra fue distinta. Además, se obtuvo un árbol filogenético basado en los 534 SNPs de las secuencias obtenidas en cada muestra y en los de la colección de genomas de coronavirus de Europa de GISAID, ofreciendo ventajas como una alta resolución y reducción del ruido evolutivo. Se observó que los SNPs de las muestras CHI21070 (*Barbastella barbastellus*) y CHI21032 (*Myotis bechsteinii*) fueron posicionados cercanamente a aquellos provenientes de secuencias genómicas de SARS-CoV-2 de Francia y EE.UU., respectivamente. A pesar de mostrar baja amplificación de secuencias de SARS-CoV-2 con la PCR Artic, la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*) fue incluida en este análisis, ubicándose junto a una secuencia de SNPs de SARS-CoV-2 proveniente de EE.UU. (Figura 4).



Figura 4. Posición de las muestras amplificadas con PCR Artic en el árbol filogenético de la colección de genomas de coronavirus de Europa de GISAID

VI. DISCUSIÓN

Mediante la presente investigación exploratoria, se logró identificar coronavirus presentes en muestras de epitelio nasofaríngeo de murciélagos de Cataluña, España, y explorar de forma preliminar su relación filogenética con el SARS-CoV-2. En ellas, en base al análisis basado en SNPs, se encontraron coronavirus cercanos filogenéticamente al SARS-CoV-2 presente en muestras humanas de EE.UU. y Francia. Si bien el objetivo de esta investigación no fue estudiar la diversidad de coronavirus en murciélagos, los resultados podrían representar un punto de partida para futuras investigaciones que tengan como objetivo determinar la abundancia o diversidad de estos virus en murciélagos. En base a las secuencias objetivos de la PCR RespiCoV y de la PCR Artic, se esperaría que ambas generen una concentración de amplicones semejante con respecto al SARS-CoV-2. No obstante, la PCR Artic generó una mayor concentración de amplicones de este virus en solo una de las dos muestras del mismo. Una hipótesis que explica lo observado es que la otra muestra produjo amplicones inespecíficos debido a un posible error de hibridación de los cebadores, lo que impidió su detección mediante la PCR Artic. Además, como indica Sidstedt et al. (2020), la presencia de inhibidores de PCR en la muestra es capaz de afectar la amplificación de secuencias virales, tales como hemoglobina, polisacáridos, etanol, detergentes o proteínas inhibidoras. No se tuvo información sobre cómo se hizo la conservación de las muestras control, por lo que no se puede descartar la presencia de inhibidores de PCR en la muestra de SARS-CoV-2 en la cual no se obtuvieron amplicones.

De las 100 muestras utilizadas, se obtuvieron ocho muestras con concentración suficiente de ARN para poder continuar con los demás procedimientos (Tabla 2), lo que podría deberse a fallos en la colecta de la muestra. Una posible causa de estos fallos puede ser el desconocimiento de los protocolos de colecta y almacenamiento, lo que es una limitación en esta tesis, como se mencionó en el punto IV.4.4. La posibilidad de no haber obtenido lecturas de concentración de ARN debido a contaminación de los reactivos utilizados se descarta, puesto que se usó un kit de extracción abierto previamente y uno nuevo, obteniendo los mismos resultados con ambos.

Respecto a la identificación de SARS-CoV-2, solo cuatro de seis muestras mostraron una alta amplificación (CHI21070 y CHI21032). Esto podría explicarse debido a que las muestras

fueron nasofaríngeas, en las cuales otros estudios han demostrado que suele encontrarse baja concentración de ARN de SARS-CoV-2 (Hitzenbichler et al., 2021).

Así también, los resultados de la PCR RespiCoV mostraron que no se obtuvo la concentración mínima requerida para continuar con el análisis. Este resultado es similar al obtenido por Gharabaghi et al. (2013), cuyo estudio se basó en la comparación de la sensibilidad y especificidad de ensayos comerciales de PCR multiplex en la detección de virus respiratorios, observando que algunos de ellos no generaban una amplificación significativa de secuencias de coronavirus ni de adenovirus en comparación a los demás. Una posible hipótesis es que esto se deba a las características propias de los reactivos de cada ensayo, al estado de los mismos o al protocolo utilizado en sí.

Por otro lado, Corman et al. (2014) destacaron la necesidad de modificar cebadores de la PCR RespiCoV debido a la alta diversidad genética de los coronavirus en murciélagos, no hacerlo puede generar falsos negativos. Por su parte, Hu et al. (2017) mencionaron que el uso de cebadores universales para Betacoronavirus en murciélagos puede subestimar la diversidad viral, con amplificación inconsistente en ciertas muestras. Por ende, la ausencia de amplificación significativa podría deberse a una divergencia genética entre los coronavirus de murciélagos y los de humanos que detecta la PCR RespiCoV. Considerando que los controles positivos mostraron amplificación mediante la PCR RespiCoV (Tabla 1), la no amplificación a partir de las muestras de murciélagos (muestras CHI21034 y CHI21104, Tabla 2), podría indicar que es probable que los virus presentes en dichas muestras no pertenezcan a los del panel RespiCoV (Anexo 2). Esto tiene sentido, ya que dicho panel contiene patógenos que infectan al ser humano, y no necesariamente a los murciélagos.

Como dato adicional, a partir de los resultados de la muestra CHI21034 (*Myotis bechsteinii*), se podría decir que esta no contiene ni SARS-CoV-2, ni virus del panel RespiCoV. Esto guarda relación con lo encontrado en la literatura, puesto que no se ha evidenciado la presencia de Betacoronavirus (clado al que pertenecen los virus del tipo SARS- CoV) en *Myotis* (Popov et al., 2023).

Asimismo, se ha reportado la presencia de Alphacoronavirus en muestras de heces e hisopado nasofaríngeo de especies del género *Myotis*, como *M. daubentonii*, *M. chiloensis* (Waterhouse, 1840) y *M. dasycneme* (Boie, 1825) en Suecia, Chile y Dinamarca respectivamente (Lwande et al., 2022; Aguilar et al., 2022; Lazov et al., 2021). En síntesis, se

podría hipotetizar que la muestra CHI21034 (*Myotis bechsteinii*) podría contener Alphacoronavirus, algo observado en la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*), aunque ambas muestras pertenecieron a la misma especie. A diferencia de la muestra CHI21034, solo en la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*), se detectó la presencia del Betacoronavirus Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008 (Figura 1), un virus relacionado a los del tipo SARS-CoV previamente identificado en *Rhinolophus blasii* (Peters, 1866) en Bulgaria y cuya proteína espícula tiene un 75% de identidad con la del SARS-CoV (Drexler et al., 2010). Además, se observó la presencia de virus relacionados a los del tipo SARS- CoV. Este hallazgo podría representar el primer reporte de cuatro Betacoronavirus distintos en una muestra de *Myotis bechsteinii*. Parte de hacer investigaciones a nivel preliminar es la obtención de resultados inesperados, como en este caso. No obstante, estos pueden representar un punto de partida para otras investigaciones que sí aborden la diversidad total de virus en murciélagos.

Por otra parte, estudios previos dedicados a la detección de coronavirus en murciélagos han reportado la presencia de Alphacoronavirus en muestras de heces e hisopado nasofaríngeo de *Myotis emarginatus* en Francia, Luxemburgo y Georgia (Urushadze et al., 2021; Monchatre et al., 2017). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio con respecto a la muestra CHI21124 (*Myotis emarginatus*) (Figura 3).

Los datos de secuenciación de los amplicones de la PCR Pancov (Anexo 8) indicaron que hay un número de reads considerablemente alto en la muestra CHI21070 (*Barbastella barbastellus*), lo que podría indicar que la concentración de coronavirus en dicha muestra es bastante elevada. Sin embargo, estudios previos no evidencian la presencia de coronavirus en *Barbastella barbastellus* (Moraga-Fernández et al., 2022). Por ende, una posible explicación de lo observado en la muestra podría ser que el individuo del que proviene haya estado atravesando un proceso de infección ocasional producido posiblemente por un coronavirus relacionado a los del tipo SARS- CoV (Nishizato et al., 2025), que fue el único coronavirus detectado en la muestra (Figura 2). Además, mediante la PCR Artic, se obtuvieron amplicones, es decir, se puede proponer la hipótesis de que el coronavirus presente en la muestra podría haber sido el SARS-CoV-2 o un virus con una secuencia del gen RdRp muy similar. La alta concentración de este tipo de virus en la muestra CHI21070 de *Barbastella barbastellus* sugiere que podrían estar replicándose activamente no solo en este individuo, sino en otros de la misma especie, como se ha reportado anteriormente en murciélagos y otros mamíferos (Chakraborty, 2020; Temmam et al., 2021). Estos hallazgos resaltan la importancia

de continuar monitoreando la diversidad de los coronavirus presentes en murciélagos y posibles eventos de recombinación genética que podrían facilitar la adaptación a nuevos hospederos, incluidos los humanos.

Por otro lado, se esperaba que la muestra CHI21032 (*Myotis bechsteinii*), que generó el mayor número de amplicones con la PCR Artic en comparación con las demás muestras, esté incluida en las muestras que amplificaron con la PCR Pancov, cuyos cebadores amplifican todo tipo de coronavirus. Sin embargo, esto no sucedió (Tabla 2), lo que podría deberse a que, al ser una Nested PCR, la primera PCR del protocolo de la PCR Pancov amplifica un fragmento del genoma que, entre otros, incluye al gen RdRp.

Para la segunda PCR, se utilizaron cebadores diseñados a partir de una secuencia consenso que hibridan con la secuencia del gen RdRp, la cual podría tener diferencias mínimas entre las especies de coronavirus. En este caso, los cebadores no serían tan específicos para amplificar la secuencia de este gen propia del SARS-CoV-2 o la presencia de mutaciones puntuales podría evitar la hibridación de los mismos, como indican ciertos autores (Eskier et al., 2020; Jung et al., 2020; Vogels et al., 2020). Esto explicaría por qué la muestra CHI21032 (*Myotis bechsteinii*), que generó amplicones de SARS-CoV-2 (mediante la PCR Artic específica para este virus), no mostró amplicones de coronavirus mediante la PCR Pancov. Adicionalmente, es probable que la muestra haya contenido muy poca concentración de coronavirus en general, lo que explicaría que la PCR Pancov no generara una amplificación relevante (Tabla 2). Sin embargo, entre ellos parece haber presencia de SARS-CoV-2, razón por la cual sí se obtuvieron amplicones con la PCR Artic (Tabla 2).

Por otro lado, en la muestra CHI21124 (*Myotis emarginatus*), cuyo número de amplicones para coronavirus fue alto (Tabla 2), se obtuvo una cantidad relativamente baja de reads. Todo indica que un alto número de amplicones en esta muestra pertenece a coronavirus desconocidos, pues no fue capaz de clasificar el 88,1% de los reads obtenidos (Anexo 8). De ser así, se podría proponer un análisis filogenético más detallado de esta muestra ya que podría reportarse la presencia de nuevos coronavirus en murciélagos.

Se observó que ciertas muestras sometidas a la PCR Pancov amplificaron secuencias de organismos diferentes a coronavirus. Algunas fueron de virus diferentes a coronavirus, lo que podría deberse a la presencia del gen RdRp en su genoma, algo muy probable debido que este codifica una ARN retrotranscriptasa (Duflos et al., 2023).

Así también, a partir de los datos de la Tabla 3, se podría decir que hubo, en promedio, seis especies diferentes de coronavirus por muestra en cada individuo. Empero, para poder determinar si esto es correcto, sería necesario el uso de una muestra mayor, con el objetivo de obtener mayor cantidad de extracciones de ARN con concentración significativa para el análisis. Además, el virus con mayor abundancia relativa entre las muestras fue el SARS-CoV, dando indicios de que los murciélagos pueden ser infectados por el mismo o ser reservorios, lo que podría confirmarse al conocer el estado de salud del individuo del que se extrajo la muestra.

Se identificaron 18 especies de coronavirus en las ocho muestras de murciélagos de Cataluña analizadas. Este número de especies de coronavirus es alto en comparación con el observado en distintas zonas geográficas, en donde se ha identificado una menor cantidad de coronavirus en muestras de murciélagos (Delaune et al., 2021; Yadav et al., 2020). Podría considerarse que los murciélagos que habitan en la región de Cataluña poseen gran cantidad de coronavirus, incluyendo especies como Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008, Human coronavirus 229E, coronavirus del tipo SARS- CoV, entre otros (Tabla 3).

Con el análisis bioinformático de las secuencias de los amplicones obtenidos por la PCR Artic, se observó que los murciélagos de Cataluña presentan coronavirus del tipo SARS-CoV con SNPs semejantes a los de SARS-CoV-2 de Europa, específicamente con los presentes en Francia; país ubicado geográficamente junto a Cataluña. Además, el hecho de que la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*) se ubicara en el árbol filogenético, entre una de EE.UU. y Francia, hace difícil afirmar con cuál de las dos tiene mayor similitud, aunque parece que sería con la proveniente de Francia ya que son las predominantes en la zona del árbol analizado. La muestra CHI21070 (*Barbastella barbastellus*), que contiene coronavirus con SNPs casi idénticos a los de SARS-CoV-2 de Francia, también está cercanamente relacionada con la muestra CHI21035 (*Myotis bechsteinii*). Este hecho podría indicar que los coronavirus en ambas muestras son bastante similares entre sí en comparación con aquellos de la muestra CHI21032 (*Myotis bechsteinii*), que se ubica más lejana formando un mismo clado con una muestra de EE.UU. En síntesis, podría decirse que los coronavirus de las muestras de EE.UU. (obtenidos a partir de humanos), al igual que los de las muestras analizadas (obtenidos a partir de murciélagos), poseen SNPs muy semejantes a los de SARS-CoV-2 de muestras francesas. A pesar de limitaciones como la falta de información sobre el procedimiento de toma de muestra y almacenamiento, y la obtención de concentración aceptable de ARN en un bajo

número de muestras, esta investigación obtiene información útil y permite, con los resultados, respaldar la hipótesis de que los coronavirus identificados en murciélagos de Cataluña se encuentran cercanamente relacionados filogenéticamente con el virus SARS-CoV-2.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se identificó una serie de especies de coronavirus en muestras nasofaríngeas de murciélagos de Cataluña, entre los cuales estuvieron presentes coronavirus con SNPs muy cercanos filogenéticamente a SNPs del SARS-CoV-2.

Asimismo, se recomienda tener un mayor control y anotación de los procedimientos de toma de muestra y almacenamiento, lo cual podría influenciar en el número de muestras que presenten ARN estable y por ende una concentración óptima para continuar con los estudios. Además, se sugiere el uso conjunto de la PCR RespiCoV y PCR Artic para lograr mayor precisión al momento de identificar la presencia de virus cercanos filogenéticamente al SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo de murciélagos.

Las relaciones filogenéticas observadas sugieren la necesidad de evaluar el potencial de estos coronavirus en la infección en modelos animales. Por ello, se recomienda un mayor análisis de los coronavirus semejantes al SARS-CoV-2 de murciélagos de Cataluña, enfocados a evaluar su patogenicidad en otros modelos animales, para determinar la posibilidad de transmisión entre especies.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar Pierlé, S., Zamora, G., Ossa, G., Gaggero, A., & Barriga, G. P. (2022). The Myotis chiloensis guano virome: viral nucleic acid enrichments for high-resolution virome elucidation and full Alphacoronavirus genome assembly. *Viruses, 14*(2), 202.

Alkhovsky, S., Lenshin, S., Romashin, A., Vishnevskaya, T., Vyshemirsky, O., Bulycheva, Y., ... & Gitelman, A. (2022). SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus spp*.) in Russia, 2020. *Viruses*, *14*(1), 113.

Álvarez Mora, D., Díaz Rodríguez, I. M., Flores Domínguez, T., Peña Chávez, M., & Montero Ayala, O. (2021). Modelos matemáticos aplicados a la Epidemiología. *Multimed*, *25*(1).

ARTIC Network. (s.f.). nCoV-2019 sequencing protocol v3 (LoCost) [Protocolo]. Recuperado el 14 de agosto de 2025, de https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-v3-locost-bp2l6n26rgqe/v3?version_warning=no

Balkema, A., Bokelmann, M., & Balkema-Buschmann, A. (2021). Coronaviruses in bats. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 134, 1-16.

Bayat, A. (2002). Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ: British Medical Journal*, *324*(7344), 1018.

Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2020). Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics, 36*(4), 1303-1304.

Brinkmann, A., Uddin, S., Ulm, S. L., Pape, K., Förster, S., Enan, K., ... & Nitsche, A. (2022). RespiCoV: Simultaneous identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and 46 respiratory tract viruses and bacteria by amplicon-based Oxford-Nanopore MinION sequencing. *Plos one*, *17*(3), e0264855.

Chakraborty, K. (2020). COVID-19: Zoonotic Origin, Interspecies Transmission, Virus-Host Interaction and Animals Susceptibility to SARS-CoV-2. *EC Pulmonol Respir Med, 9*, 52-60.

Cordoves, E. G. P., & Severo, A. M. (2022). Un acercamiento a los modelos epidemiológicos poblacionales. *Infodir (Revista de Información para la Dirección en Salud)*, 18(37), 1-19.

Corman, V. M., Ithete, N. L., Richards, L. R., Schoeman, M. C., Preiser, W., Drosten, C., & Drexler, J. F. (2014). Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *Journal of virology, 88*(19), 11297–11303. https://doi.org/10.1128/JVI.01498-14

Cortés, M. E. (2020). Coronavirus zoonótico SARS-CoV-2: La búsqueda del misterioso hospedero intermediario. *Revista Médica Herediana*, *31*(2), 138-140.

De Coster, W. (2017). *NanoFilt: filtering and trimming long-read sequencing data* [Software]. GitHub. Disponible en https://github.com/wdecoster/nanofilt

Delaune, D., Hul, V., Karlsson, E. A., Hassanin, A., Ou, T. P., Baidaliuk, A., ... & Duong, V. (2021). A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia. *Nature communications*, *12*(1), 6563.

Delgado, J. A. (2021). Modelo dinámico de la pandemia de COVID19. *Sanidad Militar*, *77*(1), 7-16.

Deng, L., Yin, H., Tan, K. S., & Tsaousis, A. D. (2024). Zoonotic diseases: epidemiology, multi-omics, and host-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1454659.

Devaux, C. A., & Fantini, J. (2023). ACE2 receptor polymorphism in humans and animals increases the risk of the emergence of SARS-CoV-2 variants during repeated intra- and inter-species host-switching of the virus. *Frontiers in Microbiology*, 14.

Drexler, J. F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V. M., Muth, D., Goettsche, M., ... & Drosten, C. (2010). Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *Journal of virology, 84*(21), 11336-11349.

Duflos, C., & Michiels, T. (2023). Regulation of viral RNA-dependent RNA polymerases by phosphorylation. Frontiers in Virology, 3, 1176840.

Eskier, D., Karakülah, G., Suner, A., & Oktay, Y. (2020). RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. *PeerJ, 8*, e9587.

European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union one health 2020 zoonoses report. *EFSA Journal, 19*(12), e06971.

Frutos, R., Serra-Cobo, J., Chen, T., & Devaux, C. A. (2020). COVID-19: Time to exonerate the pangolin from the transmission of SARS-CoV-2 to humans. *Infection, Genetics and Evolution, 84*, 104493.

Gharabaghi, F., Hawan, A., Drews, S. J., & Richardson, S. E. (2011). Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clinical microbiology and infection, 17*(12), 1900-1906.

Ge, X. Y., Li, J. L., Yang, X. L., Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., ... & Shi, Z. L. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 503(7477), 535-538.

Generalitat de Catalunya (28 de octubre de 2023). *Medio ambiente y sostenibilidad*. Disponible en: https://mediambient.gencat.cat

Griffiths, E. J., & Brinkman, F. S. (2020). Molecular Evolution and Phylogenetic Analysis. *Bioinformatics*, 251.

Hardmeier, I., Aeberhard, N., Qi, W., Schoenbaechler, K., Kraettli, H., Hatt, J. M., ... & Kubacki, J. (2021). Metagenomic analysis of fecal and tissue samples from 18 endemic bat species in Switzerland revealed a diverse virus composition including potentially zoonotic viruses. *PLoS One*, 16(6).

Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (Vol. 6, pp. 102-256). México: McGraw-Hill.

Hitzenbichler, F., Bauernfeind, S., Salzberger, B., Schmidt, B., Wenzel, J.J. (2021). Comparison of Throat Washings, Nasopharyngeal Swabs and Oropharyngeal Swabs for Detection of SARS-CoV-2. *Viruses*, *13*, 653.

Holbrook, M. G., Anthony, S. J., Navarrete-Macias, I., Bestebroer, T., Munster, V. J., & van Doremalen, N. (2021). Updated and validated pan-coronavirus PCR assay to detect all coronavirus genera. *Viruses*, *13*(4), 599.

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

Hu, D., Zhu, C., Ai, L., He, T., Wang, Y., Ye, F., ... & Wang, C. (2018). Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerging microbes & infections*, *7*(1), 1-10.

Ip, H. S., Griffin, K. M., Messer, J. D., Winzeler, M. E., Shriner, S. A., Killian, M. L., ... & Blehert, D. S. (2021). An opportunistic survey reveals an unexpected coronavirus diversity hotspot in North America. *Viruses*, *13*(10), 2016.

Jung, Y., Park, G. S., Moon, J. H., Ku, K., Beak, S. H., Lee, C. S., ... & Kim, H. G. (2020). Comparative analysis of primer–probe sets for RT-qPCR of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2). *ACS Infectious Diseases, 6*(9), 2513-2523.

Khare, S., et al. (2021). GISAID's Role in Pandemic Response. *China CDC Weekly*, *3(49)*, 1049–1051.

Lam, T. T. Y., Jia, N., Zhang, Y. W., Shum, M. H. H., Jiang, J. F., Zhu, H. C., ... & Cao, W. C. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, *583*(7815), 282-285.

Lambisia, A. W., Mohammed, K. S., Makori, T. O., Ndwiga, L., Mburu, M. W., Morobe, J. M., ... & Githinji, G. (2022). Optimization of the SARS-CoV-2 ARTIC network V4 primers and whole genome sequencing protocol. *Frontiers in Medicine*, *9*, 836728.

Lazov, C. M., Belsham, G. J., Bøtner, A., & Rasmussen, T. B. (2021). Full-genome sequences of Alphacoronaviruses and astroviruses from myotis and pipistrelle bats in Denmark. *Viruses, 13*(6), 1073.

Lee, S. Y., Chung, C. U., Park, J. S., Kim, Y. J., Kim, Y. S., Na, E. J., ... & Oem, J. K. (2022). Genetic diversity of bat coronaviruses and comparative genetic analysis of MERS-related coronaviruses in South Korea. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*(4).

Lefrançois, T., Malvy, D., Atlani-Duault, L., Benamouzig, D., Druais, P. L., Yazdanpanah, Y., ... & Lina, B. (2023). After 2 years of the COVID-19 pandemic, translating One Health into action is urgent. *The Lancet, 401*(10378), 789-794.

Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research, 52(1),* 78-82.

Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., ... & Feng, Z. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *New England journal of medicine*, *382*(13), 1199-1207.

Luk, H. K., Li, X., Fung, J., Lau, S. K., & Woo, P. C. (2019). Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infection, Genetics and Evolution, 71*, 21-30.

Lwande, O. W., Thalin, T., de Jong, J., Sjödin, A., Näslund, J., Evander, M., & Ecke, F. (2022). Alphacoronavirus in a daubenton's myotis bat (Myotis daubentonii) in Sweden. *Viruses, 14*(3), 556.

Monchatre-Leroy, E., Boué, F., Boucher, J. M., Renault, C., Moutou, F., Ar Gouilh, M., & Umhang, G. (2017). Identification of alpha and beta coronavirus in wildlife species in France: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses, 9*(12), 364.

Montes-Guerra, M. I., Gimena Ramos, F. N., & Díez-Silva, H. M. (2013). Estándares y metodologías: Instrumentos esenciales para la aplicación de la dirección de proyectos. *Revista de Tecnología*, 12(2), 11-23.

Moraga-Fernández, A., Sánchez-Sánchez, M., Queirós, J., Lopes, A. M., Vicente, J., Pardavila, X., ... & Fernández de Mera, I. G. (2022). A study of viral pathogens in bat species in the Iberian Peninsula: identification of new coronavirus genetic variants. *International Journal of Veterinary Science and Medicine, 10*(1), 100-110.

Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2020). Emerging pandemic diseases: how we got to COVID-19. *Cell*, *182*(5), 1077-1092.

Nanoporetech (2020). *Oxford Nanopore technologies*. Recuperado de: https://nanoporetech.com/

Nishizato, M., Imai, U., Shigenaga, C., Obata, M., Mitsunaga, S., Anggita, M., ... & Shimoda, H. (2025). Detection of various DNA and RNA viruses in bats in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Microbes and infection, 27*(2), 105425.

Organización Mundial de la Salud. (2024). *Exceso mundial de mortalidad asociado a la pandemia de COVID-19*. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/global-excess-deaths-associated-with-the-COVID-19-pandemic

Pater, A. A., Bosmeny, M. S., White, A. A., Sylvain, R. J., Eddington, S. B., Parasrampuria, M., ... & Gagnon, K. T. (2021). High throughput nanopore sequencing of SARS-CoV-2 viral genomes from patient samples. *Journal of biological methods*, *8*(COVID 19 Spec Iss).

Peiris, J. S., Guan, Y., & Yuen, K. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nature medicine*, *10*(Suppl 12), S88-S97.

Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature reviews microbiology*, *7*(6), 439-450.

Pimienta, J. y De la Orden, A. (2017). *Metodología de la Investigación*. Ciudad de México: Pearson Educación.

Popov, I. V., Ohlopkova, O. V., Donnik, I. M., Zolotukhin, P. V., Umanets, A., Golovin, S. N., ... & Ermakov, A. M. (2023). Detection of coronaviruses in insectivorous bats of Fore-Caucasus, 2021. *Scientific reports, 13*(1), 2306.

Robb, N. C., Taylor, J. M., Kent, A., Pambos, O. J., Gilboa, B., Evangelidou, M., ... & Kapanidis, A. N. (2019). Rapid functionalisation and detection of viruses via a novel Ca2+-mediated virus-DNA interaction. *Scientific Reports*, *9*(1), 16219.

Scrima, M., Cossu, A. M., D'Andrea, E. L., Bocchetti, M., Abruzzese, Y., Iannarone, C., ... & Caraglia, M. (2022). Genomic characterization of the emerging SARS-CoV-2 lineage in two districts of Campania (Italy) using next-generation sequencing. *Frontiers in Virology*, 2, 814114.

Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry, 412*(9), 2009-2023.

Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics, 30(9)*, 1312–1313.

Streicker, D. G., & Gilbert, A. T. (2020). Contextualizing bats as viral reservoirs. *Science*, *370*(6513), 172-173.

Temmam, S., Vongphayloth, K., Salazar, E. B., Munier, S., Bonomi, M., Régnault, B., ... & Eloit, M. (2021). Coronaviruses with a SARS-CoV-2-like receptor-binding domain allowing ACE2-mediated entry into human cells isolated from bats of Indochinese peninsula. hal-03417488

Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2014). The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biology, 15*, 524.

Urushadze, L., Babuadze, G., Shi, M., Escobar, L. E., Mauldin, M. R., Natradeze, I., ... & Velasco-Villa, A. (2021). A cross sectional sampling reveals novel coronaviruses in bat populations of Georgia. *Viruses, 14*(1), 72.

Valenzuela, M. T. (2020). Coronavirus: un desafío global: Coronavirus: a global challenge. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, *45*(1), 5-6.

Vogels, C. B., Brito, A. F., Wyllie, A. L., Fauver, J. R., Ott, I. M., Kalinich, C. C., ... & Grubaugh, N. D. (2020). Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT–qPCR primer–probe sets. *Nature microbiology, 5*(10), 1299-1305.

Wadas, I. y Domingues, I. (2025). Revisión sistemática de técnicas de análisis filogenético para virus de ARN mediante bioinformática. Revista Internacional de Ciencias Moleculares, 26 (5), 2180.

Wick, R. R. (2018). *Porechop: adapter trimmer for Oxford Nanopore reads* [Software]. GitHub. Disponible en https://github.com/rrwick/Porechop

Yadav, P. D., Shete-Aich, A., Nyayanit, D. A., Pardeshi, P., Majumdar, T., Balasubramanian, R., ... & Mourya, D. T. (2020). Detection of coronaviruses in Pteropus & Rousettus species of bats from different States of India. *Indian Journal of Medical Research*, *151*(2-3), 226-235.

Zhou, B., Thao, T. T. N., Hoffmann, D., Taddeo, A., Ebert, N., Labroussaa, F., ... & Beer, M. (2021). SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature*, 592(7852), 122-127.

Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). SARS-CoV-2 spillover events. *Science*, *371*(6525), 120-122.

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

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*, *382*(8), 727-733.

IX. ANEXOS

Anexo 1:

Protocolo para retrotranscripción (Adaptado a partir del protocolo de ThermoFisher: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FsuperscriptIII_man.pdf)

1. Preparar mix de reacción:

   1.1. Agregar 1 µL de hexámeros random a un tubo de 0,2 mL.

   1.2. Agregar 1 µL de dNTPs.

   1.3. Agregar 11 µL de muestra de ARN (usar mínimo 5 µL). Si se utiliza menos de este volumen de muestra, añadir agua para biología molecular hasta tener un volumen final de 13 µL.

   2. Reacción de retrotranscripción.

   2.1. Incubar a 65 °C por 5 minutos.

   2.2. Colocar en hielo por 1 minuto.

   2.3. Centrifugar a 1500 rpm por 20 segundos.

   2.4. Agregar 4 µL de 5X first strand buffer.

   2.5. Agregar 1 µL de 0,1 M de DTT.

   2.6. Agregar 1 µL de RNAsa OUT.

   2.7. Agregar 1 µL de la enzima SuperScript III RT y mezclar por pipeteo.

   2.8. Incubar a 25 °C por 5 minutos, luego a 50 °C por 60 minutos y finalmente a 70 °C por 15 minutos.

   2.9. Agregar 1 µL de RNAsa H e incubar a 37 °C por 20 minutos.

Anexo 2:

1. Listado de virus objetivo de la PCR RespiCoV. Modificado de Brinkmann et al. (2022)

Familia	Género	Especie
Adenoviridae	*Mastadenovirus*	*Human adenovirus A*
		Human adenovirus B
		Human adenovirus C
		Human adenovirus D
		Human adenovirus E
		Human adenovirus F
Coronaviridae	*Betacoronavirus*	*SARS coronavirus*
		SARS coronavirus 2
		MERS coronavirus
		Human coronavirus OC43
		Human coronavirus HKU1
	Alphacoronavirus	*Human coronavirus NL63*
		Human coronavirus 229E
Hantaviridae	*Orthohantavirus*	*Hantaan virus*
Herpesviridae	*Cytomegalovirus*	*Human cytomegalovirus*
	Lymphocryptovirus	*Epstein-Barr virus*
	Simplexvirus	*Herpes simplex virus 1*
		Herpes simplex virus 2
	Varicellovirus	*Varicella zoster virus*
Orthomyxoviridae	*Influenzavirus A*	*Influenza A virus*
	Influenzavirus B	*Influenza B virus*
	Influenzavirus C	*Influenza C virus*
Paramyxoviridae	*Respirovirus*	*Human respirovirus 1*
		Human respirovirus 3
	Rubulavirus	*Human respirovirus 2*
		Human respirovirus 4
		Mumps orthorubulavirus
	Henipavirus	*Nipah virus*
		Hendra virus
	Morbillivirus	*Measles virus*
Parvoviridae	*Bocaparvovirus*	*Human bocavirus*
Picornaviridae	*Enterovirus*	*Rhinovirus A*
		Rhinovirus B
		Rhinovirus C
		Enterovirus A
		Enterovirus B
		Enterovirus C
		Enterovirus D
	Parechovirus	*Human parechovirus*
Pneumoviridae	*Orthopneumovirus*	*Human respiratory syncytial virus*
	Metapneumovirus	*Human metapneumovirus*

2. Lista de especies de murciélagos cuya muestra fue usada en este estudio https://docs.google.com/spreadsheets/d/1vr1gOn9QFgjLdcJskxSqHApvMbzJrCDg/edit?gid=1268327019#gid=1268327019

Anexo 3:

Protocolo de extracción de ARN a partir de hisopados (adaptado a partir del protocolo de Sigma Aldrich: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/365/400/rnb100bul-ms.pdf)

1. Lisis:
    1.1. Añadir 600 µL de Buffer RL (incluido en el kit) a un tubo de microcentrífuga de 1,7 mL.
    1.2. Cortar la punta de algodón donde se recogieron células nasales y colocar en el tubo anterior.
    1.3. Vortexear unos segundos e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
    1.4. Transferir el lisado a otro tubo de microcentrífuga y anotar el volumen.
    1.5. Añadir un volumen igual de etanol 70%. Vortexear por unos segundos.
2. Purificación:
    2.1. Unión de ARN a la columna:
        2.1.1. Colocar una columna en un tubo de elución (incluidos en el kit) y agregar 600 µL de lisado
        2.1.2. Centrifugar a 6000 rpm por 1 minuto.
        2.1.3. Descartar sobrenadante. Repetir todos los pasos hasta acabar con todo el lisado.
    2.2. Lavado de la columna:
        2.2.1. Agregar 400 µL de Wash Solution A a la columna y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto
        2.2.2. Descartar sobrenadante. Repetir ambos pasos 2 veces.
        2.2.3. Centrifugar a 6000 rpm por 30 segundos para secar la columna.
    2.3. Elución del ARN:
        2.3.1. Trasladar la columna a un tubo de 1,7 mL y agregar 50 µL de Elution solution A.
        2.3.2. Centrifugar a 2000 rpm por 2 minutos y luego a 14000 rpm por 1 minuto.
        2.3.3. Descartar la columna y conservar el tuvo con el sobrenadante.

Anexo 4:

Protocolo de cuantificación de ARN con fluorímetro Qubit (Adaptado a partir del protocolo de Life Technologies: http://www.ion.ac.cn/ggpt/ggjsfwzx/zyjspt/fzxbjspt/yqlb_154652/201906/W020190620573149064971.pdf)

1. Preparación de la Working solution:
    1.1. Calcular la cantidad de buffer y pigmento que se va a utilizar. Volúmenes (µL) utilizados para cuantificar n muestras:
        - Pigmento: n + 1
        - Buffer: (n + 1) * 199
    1.2. Agregar los volúmenes calculados a un tubo de centrífuga de 15 mL.
    1.3. Vortexear por 1 minuto.
2. Preparación de solución para cuantificar:
    2.1. Agregar 198 µL de la Working solution preparada y 2 µL de ARN purificado a un tubo de Qubit (proporcionado por el kit).
    2.2. Vortexear por 30 segundos y dejar reposar por 2 minutos.
3. Cuantificar:
    3.1. Colocar el tubo en el Qubit y seleccionar la opción para cuantificar ARN de cadena simple, con alta sensibilidad; además de la concentración de ARN que se va a cuantificar.

Anexo 5:

Protocolos de PCR RespiCoV, PCR PanCoV y Artic PCR:

1. PCR RespiCoV (Adaptado a partir del protocolo del enlace: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0264855)

1.1. Agregar 3 µL de ADNc a un tubo de 0,2 mL.

1.2. Agregar 13 µL de la enzima LongAmp

1.3. Agregar 1,6 µL de cebadores de 10 µM (a partir de un tubo con los cebadores forward y reverse en solución. Secuencias disponibles en https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264855.s001).

1.4. Agregar 7,4 µL de agua para biología molecular.

1.5. Colocar en el termociclador y utilizar el programa propuesto en el enlace.

2. PCR PanCoV (Adaptado a partir del protocolo del enlace: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8067199/)

2.1. PCR 1:

2.1.1. Agregar 3 µL de ADNc a un tubo de 0,2 mL.

2.1.2. Agregar 13 µL de la enzima LongAmp

2.1.3. Agregar 2,5 µL de cebadores forward (5′-GGTGGGAYTAYCCHAARTGYGA-3′) y 2,5 µL de cebadores reverse (5′-CCRTCATCAGAHARWATCAT-3′).

2.1.4. Agregar 4 µL de agua para biología molecular.

2.2. PCR 2:

2.2.1. Agregar 1 µL del producto de la PCR 1 a un tubo de 0,2 mL.

2.2.2. Agregar 13 µL de la enzima LongAmp

2.2.3. Agregar 1 µL de cebadores forward (5′-GAYTAYCCHAARTGTGAYAGA-3′) y 1 µL de cebadores reverse (5′-CCRTCATCACTHARWATCAT-3′).

2.2.4. Agregar 9 µL de agua para biología molecular.

2.3. Colocar en el termociclador y utilizar el programa propuesto en el enlace.

3. Artic PCR (Adaptado a partir del protocolo del enlace: https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-v3-locost-bp2l6n26rgqe/v3)

3.1. Reacción 1:

3.1.1. Agregar 12,5 µL de la enzima LongAmp a un tubo de 0,2 mL.

3.1.2. Agregar 4 µL de Pool 1 de cebadores.

3.1.3. Agregar 6 µL de agua para biología molecular.

3.1.4. Agregar 2,5 µL de ADNc.

3.2. Reacción 2:

3.2.1. Agregar 12,5 µL de la enzima LongAmp a un tubo de 0,2 mL.

3.2.2. Agregar 4 µL de Pool 2 de cebadores.

3.2.3. Agregar 6 µL de agua para biología molecular.

3.2.4. Agregar 2,5 µL de ADNc de la misma muestra usada anteriormente.

3.3. Colocar en el termociclador y utilizar el programa propuesto por Lambisia (2022).

Anexo 6:

Protocolo de secuenciación Rapid barcoding sequencing (adaptado a partir del protocolo de Oxford Nanopore: https://community.nanoporetech.com/protocols/rapid-barcoding-sequencing-sqk-rbk004/checklist_example.pdf)

1. Preparación de bibliotecas:
    1.1. Agregar 7,5 µL de producto de PCR en un tubo de 1,7 mL.
    1.2. Agregar 2,5 µL de Barcode. Agregar uno diferente a cada tubo utilizado.
    1.3. Incubar a 30 °C por 1 minuto, luego a 80 °C por 1 minuto. Finalmente, poner los tubos en hielo.
    1.4. Combinar todas las muestras y anotar volumen final (ejemplo: volumen n).
    1.5. Vortexear beads y agregar el mismo volumen n al tubo con las muestras combinadas.
    1.6. Hacer flicking al tubo por 5 minutos y luego centrifugar 30 segundos.
    1.7. Colocar el tubo abierto en el magneto por 1 minuto o hasta identificar que todas las beads están adheridas a la pared del tubo. Luego quitar el sobrenadante.
    1.8. Agregar 200 µL de etanol al 70% para el lavado. Hacer este paso dos veces.
    1.9. Centrifugar por 30 segundos para que el etanol restante se deposite en el fondo del tubo.
    1.10. Colocar el tubo en el magneto nuevamente por 1 minuto. Quitar el sobrenadante y dejar el tubo abierto por 30 segundos, para que el etanol restante se evapore.
    1.11. Retirar el tubo del magneto y agregar 10 µL de agua para biología molecular, para separar las beads del ADN.
    1.12. Colocar el tubo abierto en el magneto nuevamente por 1 minuto o hasta identificar que todas las beads están adheridas a la pared del tubo.
    1.13. Trasladar el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL.
    1.14. Añadir 1 µL de RAP y mezclar por flicking y luego centrifugar unos segundos.

1.15. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

2. Preparación de la Flow cell para secuenciar:
   2.1. Marcar una micropipeta en 200 µL.
   2.2. Colocar el tip en el Priming port de la Flow cell.
   2.3. Girar la rueda de la micropipeta hasta que el dial indique 220 µL-230 µL, con el objetivo de retirar las burbujas que puedan haber quedado dentro de la Flow cell. Detenerse una vez que se observe que el buffer (dentro de la Flow cell) alcanzó el Priming port y no quedan burbujas.
3. Preparación de Priming mix:
   3.1. Agregar 30 µL de FLT directamente al tubo de FB y mezclar en vórtex.
   3.2. Agregar 800 µL de Priming mix en el Priming port, evitar introducir burbujas. Asegurarse de que el puerto Spot-on esté cerrado en todo momento. Dejar reposar por 5 minutos.
4. Preparación de la biblioteca:
   4.1. Agregar 34 µL de SQB a un tubo de 1,7 mL.
   4.2. Agregar 25,5 µL de LB (beads, resuspender 20 veces previamente).
   4.3. Agregar 4,5 µL de agua para biología molecular.
   4.4. Agregar 11 µL de ADN del pool.
5. Preparación final de la Flow cell:
   5.1. Abrir ambos puertos (Priming port y Spot-on) y agregar 200 µL de Priming mix en el Priming port.
   5.2. Agregar 75 µL de la biblioteca (pipetear previamente para resuspender las beads) en el Spot-on, por goteo.
   5.3. Cerrar ambos puertos y cerrar la tapa del secuenciador.
   5.4. En la pantalla del secuenciador, seleccionar Start sequencing, colocar nombre al experimento y seleccionar kit Rapid barcoding.
6. Lavado de la Flow cell (utilizar Flow cell wash kit):
   6.1. Añadir 398 µL de DIL y 2 µL de WMX, ambos en un tubo de 1,5 mL (esta solución se denomina Wash buffer). Incubar en hielo.
   6.2. Extraer el buffer utilizado anteriormente de la Flow cell, a través del Waste port, manteniendo los otros dos puertos abiertos.
   6.3. Quitar burbujas a través del Priming port.

6.4. Añadir 400 µL del Wash buffer preparado anteriormente a través del Priming port. Dejar este puerto abierto y esperar 1 hora como mínimo para volver a utilizar la Flow cell.

Anexo 7:

Concentración de ARN en las muestras utilizadas

Código original de la muestra	Especie	Concentración de ARN (ng/µL)
21029	*Myotis bechsteinii*	1.89
21030	*Myotis bechsteinii*	1.47
21032	*Myotis bechsteinii*	2.31
21034	*Myotis bechsteinii*	1.77
21035	*Myotis bechsteinii*	2.48
21070	*Barbastella barbastellus*	2.1
21104	*Pipistrellus kuhlii*	2.4
21124	*Myotis emarginatus*	5.2

Anexo 8:

Visualización de datos de secuenciación de muestras sometidas a PCR Pancov

Código original	Especie	Barcode	Número de reads	reads clasificados	reads virales
CHI21124	*Myotis emarginatus*	1	18 570	11.9%	11.9%
CHI21035	*Myotis bechsteinii*	3	13 835	84.1%	84.1%
CHI21070	*Barbastella barbastellus*	4	86 789	97.8%	97.8%