

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis metagenómico para la identificación de microorganismos
en muestras de heces y saliva de murciélagos del Yasuní, Ecuador**

Mateo Carvajal Calero

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 14 de mayo de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Análisis metagenómico para la identificación de microorganismos en
muestras de heces y saliva de murciélagos del Yasuní, Ecuador**

Mateo Carvajal Calero

Nombre del profesor, Título académico

Gabriel Trueba, Ph.D.

Quito, 14 de mayo de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Mateo Carvajal Calero

Código: 00138587

Cédula de identidad: 1850104546

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Los murciélagos son mamíferos que cumplen un rol ecológico importante y que poseen una amplia distribución mundial. Son conocidos por tener una gran cantidad de virus, bacterias y eucariotas parásitos, identificados y no identificados, con potencial de ser patógenos zoonóticos. En este estudio se busca identificar qué microorganismos están presentes en una muestra de heces del murciélago *Carollia perspicillata* y en una de saliva de *Trachops cirrhosus*, ambas provenientes del Yasuní, Ecuador. El ADN de las heces y de la saliva fue secuenciado en un MinION. Las lecturas que se obtuvieron fueron ingresadas en el programa “Kaiju web server” para generar asignaciones taxonómicas. Se clasificó los géneros de interés según el número de lecturas presentes y su potencial de ser un agente patógeno. Para verificar la información, se extrajo las secuencias de interés y con el programa Minimap2 se mapeó en relación con un genoma de referencia, los resultados se observaron en el programa Tablet. Según el número de lecturas mapeadas, se extrajo las más largas y se ejecutó un Blastn para verificar el género al que corresponden. En Kaiju se obtuvo que la mayor cantidad de secuencias asignadas pertenecieron a bacterias, seguido de eucariotas y con menos del 1% virus y arqueas, por lo tanto, solo se tomó en cuenta a bacterias y eucariotas para este estudio. Los géneros de interés de bacterias identificados exitosamente fueron: *Chlamydia* spp., *Salmonella* spp. y *Haemophilus* spp. y de eucaritos: *Plasmodium* spp. Todos estos microorganismos se encontraron en ambas muestras y algunos pueden ser patógenos para humanos. Estos resultados demuestran que la metagenómica con el MinION es una herramienta versátil que permite la identificación de microorganismos en muestras de murciélagos y reafirman la idea de que estos animales pueden ser portadores de agentes patógenos y deben ser más investigados.

Palabras clave: Metagenómica, MinION, murciélagos, *Carollia perspicillata*, *Trachops cirrhosus*, *Chlamydia* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., *Plasmodium* spp.

ABSTRACT

Bats are mammals that play an important ecological role and are worldwide distributed. They are known to have many identified and unidentified viruses, bacteria and eukaryotic parasites with the potential to be zoonotic pathogens. The aim of this study is to identify which microorganisms are present in a stool sample of the *Carollia perspicillata* bat and in a saliva sample of *Trachops cirrhosis* bat, both from Yasuní, Ecuador. DNA from stool and saliva was sequenced in a MinION. The readings obtained were entered into the Kaiju web server program to generate taxonomic assignments. The genera of interest were classified according to the number of readings present and their potential to be a pathogen. To verify the information, the sequences of interest were extracted and with the Minimap2 program it was mapped in relation to a reference genome, the results were observed in the Tablet program. According to the number of mapped reads, the longest were extracted and a Blastn was run to verify the genre to which they correspond. In Kaiju, it was obtained that the highest number of assigned sequences belonged to bacteria, followed by eukaryotes and with less than 0.1% viruses and archaea, therefore, only bacteria and eukaryotes were considered for this study. The genera of interest of bacteria successfully identified were: *Chlamydia* spp., *Salmonella* spp. and *Haemophilus* spp. and eukaryotes: *Plasmodium* spp. These microorganisms were found in both samples and some may be human pathogens. These results demonstrate that metagenomics with the MinION is a versatile tool that allows the identification of microorganisms in bat samples and reaffirms the idea that these animals can be carriers of pathogens and should be further investigated.

Key words: Metagenomics, MinION, bats, *Carollia perspicillata*, *Trachops cirrhosus*, *Chlamydia* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., *Plasmodium* spp.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
Características generales de los murciélagos	11
Los murciélagos y el riesgo de zoonosis.....	11
El MinION y la metagenómica.....	13
MÉTODOS	15
Recolección de muestras y extracción de ARN	15
Preparación de la librería del MinION.....	16
Secuenciamiento y Demultiplexing	17
Asignación taxonómica y verificación.....	17
RESULTADOS.....	18
Análisis del secuenciamiento y asignación taxonómica.....	18
Bacterias.....	18
Eucariotas.....	19
Arqueas y Virus.....	19
Verificación de asignación taxonómica	19
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIÓN	24
TABLAS.....	25
FIGURAS	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras y características de los murciélagos recolectados	25
Tabla 2. Cuantificación y generación de lecturas en el secuenciador.....	25
Tabla 3. Bacterias y Eucariotas más representativos de la muestra 11.....	25
Tabla 4. Bacterias y Eucariotas más representativos de la muestra 17.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de recolección de muestras en el Yasuní.....	27
Figura 2. Porcentajes de asignación taxonómica de las lecturas en Kaiju.....	27
Figura 3. Kronas chart de la muestra 11.....	28
Figura 4. Kronas chart de la muestra 17.....	29
Figura 5. Blastn de las secuencias seleccionadas de la muestra 11.....	30
Figura 6. Blastn de las secuencias seleccionadas de la muestra 17.....	30

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODO SISPA	35
ANEXO 2: PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS	36

INTRODUCCIÓN

Características generales de los murciélagos

Los murciélagos pertenecen al orden Chiroptera (alas en las extremidades superiores) (Bonilla-Aldana et al., 2021; Han et al., 2015). Se pueden clasificar en dos subórdenes: el Yinpterochiroptera (Megachiroptera o comúnmente conocidos como mega murciélagos) y el Yangchiroptera (microchiroptera o comúnmente conocidos como micro murciélagos) (Han et al., 2015). Generalmente, los mega murciélagos comen frutas y los micro murciélagos viven de frutas, insectos, pequeños mamíferos, peces o sangre. Otra característica que los diferencia es que los mega murciélagos no poseen ecolocalización y los micro murciélagos si (excepto las especies del género *Rousettus*) (Han et al., 2015; Lei & Dong, 2016).

Los murciélagos son los únicos mamíferos que pueden volar, tienen hábitos nocturnos durante los cuales se alimentan o se aparean y están presentes en todo el mundo, con excepción de la Antártida, el Ártico y algunas islas oceánicas (Bonilla-Aldana et al., 2021). En el mundo se han reportado más de 1400 especies de murciélagos y, en Ecuador, cerca de 176, convirtiéndolos en el segundo grupo más diverso de mamíferos después de los roedores (Bonilla-Aldana et al., 2021; Tirira et al., 2020; L. F. Wang & Anderson, 2019).

Estos animales son esenciales en el ecosistema global. Están involucrados en la polinización, dispersión de semillas, depredación de insectos (control de plagas que afectan a cultivos y a humanos) y su guano rico en nitrógeno sirve como fertilizante (Allocati et al., 2016) . Debido a su asociación con muchos de los virus más letales, existe un creciente interés en los murciélagos, sin embargo, estos animales también son conocidos por sus largos periodos de vida y por ser menos propensos a distintos tipos de cáncer (L. F. Wang & Anderson, 2019).

Los murciélagos y el riesgo de zoonosis

Los murciélagos son reservorios naturales y fuentes de infección de varios virus y microorganismos que pueden causar enfermedades humanas graves y afectar a la biodiversidad global (Allocati et al., 2016). Debido a factores como la industrialización, urbanización, cambio climático y la agricultura y ganadería intensiva, el riesgo de transmisión de agentes patógenos entre especies se ha convertido en una amenaza para las poblaciones humanas y las de otros animales (L. F. Wang & Anderson, 2019). Cerca del 75% de enfermedades infecciosas emergentes son provocadas por zoonosis cuyos reservorios están en animales salvajes (Barr et al., 2018).

La mayoría de brotes virales se han originado en animales, específicamente en murciélagos (Mohsin et al., 2020). Se han detectado más de 200 tipos de virus en murciélagos, donde más de 60 especies son altamente patógenas en humanos (Hu et al., 2017). Entre algunos ejemplos están: SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERSCoV, NiV, HeV, virus del Ébola y virus de Marburg (Mohsin et al., 2020). Si bien existe evidencia sobre parásitos, bacterias y otros microorganismos transmitidos por murciélagos, los datos son muy limitados en comparación con el gran volumen de información relacionadas con virus (L. F. Wang & Cowled, 2015).

El mantenimiento y transmisión de virus y microorganismos en los murciélagos se debe, en gran parte, a su ecología. Al ser animales sociales, varios individuos están agrupados en diferentes colonias, permitiendo la circulación de microorganismos (Allocati et al., 2016). Además, ciertos murciélagos tienen la capacidad de ecolocalización para la navegación. Aparte de las ondas ultrasónicas generadas en la laringe, también pueden generar aerosoles, jugando un papel importante en la transmisión viral entre murciélagos (Han et al., 2015). Otros factores, como sus largos periodos de vida y la capacidad de volar y migrar, los convierte en grandes reservorios y propagadores de agentes patógenos (Allocati et al., 2016; L. F. Wang & Cowled, 2015).

Por un lado, los murciélagos pueden transmitir agentes infecciosos a los humanos a través de hospedadores intermediarios, que pueden entrar en contacto directo con humanos (Plowright et al., 2014). Estos intermediarios pueden infectarse de muchas formas, como la ingestión de alimentos parcialmente digeridos por los murciélagos. Por ejemplo, los murciélagos frugívoros no pueden ingerir grandes cantidades de alimento debido a la aerodinámica del vuelo, por lo tanto, extraen nutrientes masticando frutas y escupiendo los residuos. Estos residuos caen al suelo y pueden ser ingerido por otros animales, siendo una fuente infecciosa potencial (Allocati et al., 2016). También se ha descrito una modalidad similar de transmisión viral para los murciélagos insectívoros.

Por otro lado, los murciélagos también pueden infectar directamente a los humanos. Esto puede ocurrir a través de la ingestión de carne de murciélago infectada, porque en algunas áreas los murciélagos son una fuente de alimento, o por mordeduras de murciélagos como en el caso de los murciélagos vampiros infectados con rabia (Irving et al., 2021; Plowright et al., 2014).

Es importante considerar que algunos patógenos zoonóticos no causan mayor morbilidad en murciélagos, con excepción del virus de la rabia y otros Lyssavirus (Hayman, 2019). Debido a esto, pueden sobrevivir mucho tiempo dentro de su organismo sin verse afectados. Esto sugiere que pueden controlar la replicación viral de forma más eficiente que otros mamíferos (Irving et al., 2021). Ante estos acontecimientos se han propuesto diferentes explicaciones. Algunas hacen referencia a una variación inmune durante la hibernación o a las altas temperaturas que experimentan los murciélagos durante el vuelo, disminuyen las cargas virales y, por lo tanto, manteniendo su condición de reservorio viral (Bouma et al., 2010; Irving et al., 2021). Sin embargo, estudios recientes indican que los murciélagos presentan una tolerancia a la infección por virus en lugar de una reducción activa de la carga viral (Irving et al., 2021).

El MinION y la metagenómica

Debido a la asociación entre murciélagos y el creciente riesgo de zoonosis, la detección temprana de agentes patógenos en estos animales es de gran importancia para poder controlar su propagación (Franco Filho et al., 2019). Los principales análisis que se realizan incluyen: cultivo viral, cultivo bacteriano, amplificación de ácidos nucleicos, pruebas serológicas e inmunológicas, hibridación, histología y microscopía electrónica (Mohsin et al., 2020). Si bien estos métodos pueden ser muy específicos y robustos, su rango de detección es limitado por la necesidad de conocimientos previos sobre los microorganismos de estudio. Por esta razón, la metagenómica, junto a nuevas tecnologías de secuenciamiento, ofrecen la oportunidad de detección temprana de agentes patógenos conocidos y novedosos (Bergner et al., 2019).

La metagenómica con secuenciamiento de siguiente generación ofrece la posibilidad de secuenciar el material genético de una muestra, seguido de la identificación taxonómica y clasificación de cada secuencia (Greninger & Naccache, 2019). En este contexto, el MinION de Oxford Nanopore Technologies (ONT) es un dispositivo de secuenciamiento de siguiente generación, portátil y económico, capaz de producir lecturas largas en tiempo real (Leggett et al., 2020).

En base a lo planteado, el objetivo de este estudio es usar la metagenómica con el MinION para encontrar microorganismos de interés en murciélagos del Ecuador. Este es, a nuestro conocimiento, el primer estudio de este tipo en el país y busca sentar las bases de futuras investigaciones que empleen este método.

MÉTODOS

Recolección de muestras y extracción de ARN

Las muestras usadas en este estudio se recolectaron en el Parque Nacional Yasuní, en el 2017 (Anexo 1). Se capturó a los murciélagos con redes de neblina y se realizó mediciones morfológicas para la identificación de especies. Se recolectó muestras de saliva mediante un hisopado orofaríngeo y de heces esperando a que defequen después de ser capturados. Las muestras se almacenaron en viales con medio Virocult y se preservó en hielo, hasta ser transportadas al Instituto de Microbiología de la USFQ, donde permanecieron almacenadas a -80°C hasta el 2021.

El total de muestras seleccionadas para este estudio fue de 2, una de saliva y una de heces. El material genético total se extrajo usando el kit de extracción de ARN viral QIAamp (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Sin embargo, se modificó el volumen de elusión a $35\ \mu\text{L}$ se evitó el uso de DNasas.

Retrotranscripción de ARN a ADNc

El ADN complementario se generó usando un método de amplificación independiente de secuencia con un cebador único (SISPA), compuesto por dos rondas A y B (Greninger et al., 2015; Kafetzopoulou et al., 2018). Los reactivos y cantidades se detallan en el (Anexo 1). Para la reacción de la ronda A se mezcló el Sol-Primer A con la muestra de ARN, se incubó a 65°C durante 5 min y luego se enfrió a 21°C durante 5 min. Se tomó los $5\ \mu\text{L}$ resultantes de esta reacción y se añadió 5X Buffer de primera hebra, agua libre de nucleasas, dNTP's, DTT, la enzima SuperScript III y se incubó a 42°C durante 60 minutos. De esta forma, se completó la síntesis de la primera hebra de ADNc. Para la síntesis de la segunda hebra, se tomó el producto de la primera síntesis y se mezcló con agua libre de nucleasas, 5X Sequenase Buffer, enzima Sequenase y se incubó a 37°C por 8 minutos.

En la ronda B, de amplificación, se añadió 5 μ L del ADNc de la ronda-A al máster mix de 45 μ L compuesto por: agua de grado molecular, 10X Accutaq reaction mix, Sol-PrimerB, Dimetilsulfóxido, dNTP's y la polimerasa Accutaq LA (Sigma, Poole, United Kingdom). Las condiciones de la PCR fueron 98 °C durante 30 segundos, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, 50 ° C durante 20 segundos, 68 ° C durante 5 minutos, y un paso final de 68 ° C durante 10 minutos.

Preparación de la librería del MinION

Para la preparación de librerías se siguió el protocolo de Nanopore “Rapid Barcoding Expansion 13-24” (EXP-NBD114) y el protocolo de ligación (SQK-LSK109). De forma breve, se ajustó 48 μ l de ADNc con agua libre de nucleasas y en un tubo de PCR se mezcló con los reactivos del Anexo 2. Después, se incubó a 20°C por 5 minutos y a 65°C por 5 minutos y se cuantificó 1 μ l usando el kit Qubit High Sensitivity dsDNA según las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher, Waltham, EE. UU.). De esta forma concluye el paso de la reparación de ADNc.

Para la ligación de los barcodes, se realizó una reacción que incluyó el ADNc reparado, los “Native Barcodes” y la ligasa Blunt/TA Master Mix (Anexo 2). La reacción se incubó a 25°C por 10 minutos y se purificó con perlas AMPure XP, para esto, se agregó 50 μ l de perlas resuspendidas AMPure XP y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se centrifugó brevemente y con un rack magnético, se sedimentó las perlas y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el sedimento con 200 μ l de etanol al 70%, se desechó el etanol y se repitió este paso nuevamente. Se colocó en el rack magnético y se desechó cualquier resto de etanol. Luego, se agregó 25 μ l de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente por dos minutos, se centrifugó brevemente y se sedimentó las perlas con una gradilla magnética. Se retiró y se conservó 25 μ l del sobrenadante. Por último, se cuantificó 1 μ l en el Qubit. Antes

de continuar, se normalizó todas las muestras a la misma concentración de ADNc, se realizó un pool y se cuantificó nuevamente.

A continuación, se ligó los adaptadores de secuenciamiento. Se realizó una reacción con los reactivos del Anexo 2. Se incubó por 10 minutos a 22°C y se purificó con perlas AMPure XP. En esta ocasión, se lavó dos veces las perlas con 250 µl de buffer “LFB”, después se resuspendió el pellet con 15 µl de buffer de elusión, se recuperó 15 µl del sobrenadante (ADNc) y se cuantificó 1 µl con el Qubit.

Secuenciamiento y Demultiplexing

En el priming port del Minion se cargó 800 µl del priming mix (30 µl de FLT + FB). Nuevamente se agregó 200 µl del priming mix en el priming port y 75 µl de librería en el SpotON (Anexo 2). La corrida de secuenciamiento se programó con el software MinKNOW, durante 18 horas, con el basecalling en tiempo real activado y con el formato final de salida en FASTQ. Una vez que se generaron los datos, utilizando el programa Porechop (Rrwick, 2018), se agrupó las secuencias según el barcode correspondiente y se retiró los adaptadores.

Asignación taxonómica y verificación

El perfil taxonómico de las secuencias de cada muestra se asignó con el programa Kaiju web server (Menzel et al., 2016). Se usó las secuencias en formato FASTQ comprimidas en .zip, se seleccionó la base de datos “NCBI Blast nr+euk” (incluye bacterias, arqueas, hongos, virus y eucariotas), en el método de corrida se usó MEM (coincidencias exactas máximas) y el resto de los parámetros se mantuvo por defecto. Para el análisis de los perfiles taxonómicos se consideró el número de lecturas asignadas y los Krona charts generados. Para verificar que las secuencias de interés se hayan asignado correctamente, se extrajo las lecturas y se usó los programas Minimp2 y Tablet para verificar el alineamiento según un genoma de referencia y así extraer las lecturas para comprobar con un Blastn.

RESULTADOS

Se muestran los resultados obtenidos de las muestras 11 y 17, provenientes del Yasuní (Figura 1). La muestra 11 es de heces del murciélago *Carollia perspicillata* y la 17 es de saliva de *Trachops cirrhosus* (Tabla 1).

Análisis del secuenciamiento y asignación taxonómica

En la Tabla 2 se indica la concentración de ADNc previo al secuenciamiento, el número de lecturas que se produjo de cada una de las muestras y la cantidad de asignaciones de perfiles taxonómicos que se obtuvieron en Kaiju. Las concentraciones obtenidas son las ideales según los protocolos de Oxford Nanopore (11 ng/μl). La muestra 11 produjo un total de 54360 lecturas, mientras que la 17 tuvo 39511 lecturas. Estos datos se ven reflejados en la Figura 2, donde se representa el porcentaje de bacterias, eucariotas, arqueas y virus que fue asignado a cada muestra. En todos los casos, el dominio de bacterias fue el más representativo, seguido de Eucariotas, Arqueas y Virus. Por esta razón, los análisis se realizarán en base a las bacterias y eucariotas que tuvieron más lecturas en cada muestra y son patógenos de interés.

Bacterias

Como se observa en el Krona chart de la Figura 2, de *Carollia perspicillata* (Muestra 11), el filo más representativo es el de las Proteobacterias (1235 lecturas-83%) y está compuesto, principalmente, por Enterobacterias. *Escherichia coli* es el microorganismo que predomina, junto a *Haemophilus influenzae* y *Salmonella enterica* (Tabla 3).

Por otro lado, en la Figura 3 se observa el Krona chart de bacterias de *Trachops cirrhosus* (Muestra 17), en este caso, el filo predominante sigue siendo el de las Proteobacterias (5363 lecturas-44%). Sin embargo, el género *Chlamidia* es el más representativo (749 lecturas) y *Chlamydia trachomatis* (668 lecturas), es la especie que sobresale (Tabla 4).

Por la importancia patogénica de los géneros mencionados anteriormente, se consideró a *Chlamydia spp.*, *Haemophilus spp.*, *Salmonella spp.* como las bacterias a ser analizadas en este estudio.

Eucariotas

En las muestras 11 y 17 el clado de los Opisthokonta representa el 47% y 57% de las secuencias (Figura4). Sin embargo, la presencia de *Plasmodium spp.*, del filo de los Alveolata (28%-23%), está presente en ambas muestras. Por esta razón y por su importancia como agente patógeno, se consideró para ser analizada.

Arqueas y Virus

Las lecturas que se asignaron a los grupos que no son bacterias representan menos del 1% de total de lecturas, por lo tanto, no fueron considerados para análisis posteriores.

Verificación de asignación taxonómica

Al revisar las secuencias en el Blastn (Figuras 3 y 4), se comprobó que la asignación de Kaiju no fueron correctas al identificar especies, por lo tanto, se llegó solo hasta el nivel de los géneros más importantes (Figuras 3 y 4).

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los murciélagos son un reservorio importante de agentes patógenos para los humanos (Rahman et al., 2020). Si bien se han reportado más de 200 virus asociados a murciélagos, en este estudio representaron menos del 1% (Figura 2). Una de las posibles razones es que los virus de ARN, que son los que más se encuentran en murciélagos, son muy sensibles a la degradación, debido a condiciones de almacenamiento o temperatura. A pesar de que las muestras se almacenaron a -80°C y se mantuvieron en medio Virocult para conservar el material genético, el tiempo de almacenamiento, de casi 4 años, pudo contribuir significativamente a su deterioro (Bergner et al., 2019). Otro aspecto importante es que, en los análisis metagenómicos, los genomas son secuenciados al azar y el material genético de bacterias y eucariotas, por ser de mayor tamaño, tiene preferencia para ser detectado en comparación con genomas pequeños de los virus (Bergner et al., 2019). Esto se ve reflejado en que la mayor cantidad de secuencia obtenidas en el estudio pertenecen a bacterias y eucariotas (Figura 3 y 4).

Por esta razón y, considerando la posibilidad de ser patógenos potenciales, se seleccionaron cuatro géneros de bacterias y uno de eucariotas presentes en cada muestra y que se describen a continuación.

Chlamydia spp.

El género *Chlamydia* pertenece a la familia Chlamydiaceae del orden de los Chlamydiales (Pilloux et al., 2015). Estas son bacterias intracelulares que se han adaptado para colonizar un amplio rango de vertebrados (Bachmann et al., 2014). Por ejemplo, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* son patógenos humanos establecidos. Sin embargo, también existen patógenos conocidos de otros animales como: *C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. suis* y *C. muridarum* (Hokynar et al., 2017). La relación entre los murciélagos y especies del género *Chlamydia* no es clara. Sin embargo, existen estudios como el de Veikkolainen et al. (2014), donde se analizó

bacterias presentes en heces del murciélago *Myotis daubentonii* en Finlandia y se encontró que el género *Chlamydia* fue uno de los dominantes. En este caso, se especula que el material genético se encontró presente en heces debido a sangrados del intestino o a la ingesta de ectoparásitos hematófagos que pueden contener la bacteria. En caso de ser cierto, las diferentes especies de *Chlamydia* pueden ser patogénicas para los murciélagos o estos pueden servir de vectores. En otro estudio, desarrollado por Fritschi et al. (2020), se analizó órganos internos de murciélagos de Suiza y Alemania, entre estos murciélagos se consideró a *Carollia perspicillata*. En el estudio se analizó las secuencias ribosomales 16s y 23s y se concluyó que estas pueden pertenecer a nuevas especies de *Chlamydia*. El hecho de que el análisis se realizó en tejidos sugiere que los murciélagos pueden actuar como reservorios de estas bacterias.

En este estudio se encontró secuencias genéticas de *Chlamydia* en *C.perspicillata* y *T. cirrhosus* (Tabla 3). Considerando que ambas especies tienen hábitos alimenticios distintos (Tabla 1) y que las muestras analizadas son diferentes, se puede hipotetizar que hay especies de murciélagos que son hospedadores de esta bacteria. Sin embargo, aún son necesarios más estudios para identificar las especies presentes, si son patógenas y si presentan riesgo de zoonosis.

Slamonella spp.

El género *Salmonella* tiene más de 2.500 serotipos identificados que se incluyen en dos especies: *Salmonella enterica* y *S. bongori* (Abebe et al., 2020). El hábitat principal de las especies de *Salmonella* es el tracto intestinal de animales de granja, humanos, aves, reptiles e insectos. Los animales son el reservorio de enfermedades de *Salmonella* transmitidas por los alimentos (Hilbert et al., 2012). Se considera que las especies ganaderas y las aves silvestres son un importante reservorio de serotipos de *Salmonella* patógena para los seres humanos (Mühldorfer, 2013). Existen varios estudios de *Salmonella* en murciélagos. Muchos reportan serotipos de *Salmonella* aislados de murciélagos que tienen características similares a los

encontrados en ganado y en humanos, lo que significa que los murciélagos pueden ser localmente importantes en la epidemiología de la salmonelosis en humanos y en el ganado (Allocati et al., 2016). Sin embargo, también se han realizado estudios de tejidos de murciélago muertos donde se encontró *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e incluso *Salmonella* Typhi (Mühldorfer, 2013).

Considerando que las muestras 11 y 17 de este estudio fueron recolectadas en el Yasuní (Figura 1), un área prístina y en la que se esperaría que los murciélagos no tengan contacto directo con animales de granja o humanos, la posibilidad de que existan especies de *Salmonella* que han sido transmitidas a murciélagos es baja, en consecuencia, las especies de *Salmonella* presentes pueden corresponder a nuevos serotipos propios de los murciélagos (Bass et al., 2010; Hilbert et al., 2012). Es importante destacar que la explotación petrolera en el Yasuní, la deforestación para agricultura o ganadería junto a otros factores, pueden ser un detonante para la zoonosis de diferentes serotipos de *Salmonella*, que afecta a humanos, otros animales y a los propios murciélagos.

Haemophilus spp.

El género *Haemophilus* pertenece a la familia Pasteurellaceae. *Haemophilus influenzae* es la especie que se asocia con mayor frecuencia a enfermedades en humanos. *Haemophilus aegyptius* y *Haemophilus ducreyi* también presentan relevancia como agentes patógenos. Sin embargo, los otros miembros de este género son comensales en personas sanas (Murray et al., 2014). Respecto a los murciélagos, no existe información sobre las especies que se encuentran en estos animales. En un estudio de Dietrich et al. (2018), se encontró especies del género *Haemophilus* en muestras de heces y saliva del murciélago *Miniopterus natalensis* y en otros estudios se ha identificado miembros de especies del género *Pasteurella*, que también pertenece a la familia Pasteurellaceae (Mühldorfer et al., 2014). Esta información respalda el haber encontrado material genético del género *Haemophilus* en las muestras de heces y saliva

(11 y 17). Si bien no se conocen especies de este género que se propaguen por contribución de animales o del ambiente, el hecho de que existan especies de esta bacteria en murciélagos amerita más investigación al respecto.

Plasmodium spp.

La malaria es una enfermedad transmitida por mosquitos y causada por parásitos del género *Plasmodium*. Se conoce que esta enfermedad infecta a mamíferos, reptiles y aves. Las especies de *Plasmodium* que infectan animales no humanos son de gran interés porque pueden transmitirse, natural o accidentalmente, a los humanos y provocar enfermedades graves (Murray et al., 2014). En un estudio realizado por de Assis et al. (2016) se identificó, mediante análisis de sangre, que los murciélagos frugívoros africanos *Myonycteris angolensis* y *Roussettus smithi* estaban infectados con *Plasmodium voltaicum* y *P. cyclopsi*, estas especies son muy similares a la de ciertos roedores, lo que sugiere que existe un patrón de intercambios múltiples entre *Plasmodium* de quirópteros y roedores. Esto se complementa con que los murciélagos, posiblemente, juegan un rol como mayores promotores de la diversificación de *Plasmodium* en mamíferos (Galen et al., 2018).

A nuestro conocimiento, en Ecuador no existen estudios de *Plasmodium* en murciélagos, el hecho de que se haya encontrado especies de este género en las muestras de este estudio abre el camino para realizar más investigaciones en esta área e identificar posibles patógenos de interés y comprender la evolución de este parásito. Además, tanto en las muestras 11 como 17 se encontró la presencia de *Plasmodium*, esto sugiere que, como ya se ha reportado en estudios previos en monos, tanto las muestras de heces como de saliva son útiles para detectar este parásito y de esta forma evitar métodos más complicados que involucren extracción de sangre (de Assis et al., 2016).

CONCLUSIÓN

El análisis metagenómico con el MinION demostró ser una técnica útil para identificar microorganismos en muestras de heces y saliva de murciélagos. El uso de Kaiju web server para la identificación taxonómica también probó ser de gran utilidad y con una baja dificultad de operación. Sin embargo, también se observó que es necesario verificar la información generada en Kaiju para garantizar los resultados obtenidos. Los datos reportados van de la mano con que los murciélagos poseen microorganismos que pueden ser de interés por su riesgo de zoonosis y patogenicidad y que, por los efectos de cambio climático y destrucción de ecosistemas, pueden transmitirse a humanos y otros animales, provocando enfermedades graves. Además, se debe considerar que las muestras analizadas son del 2017, por lo tanto, es necesario tomar muestras actualizadas para realizar nuevos estudios de este tipo. A nuestro conocimiento, este es el primer estudio de este tipo en Murciélagos del Ecuador y confirma que la metodología propuesta funciona bien.

TABLAS

Tabla 1. Características y muestras de los murciélagos recolectados

Código	Tipo de Muestra	Especie de Muerciélago	Gremio	Género	Lugar de recolección	Fecha de recolección
11	Heces	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugivoro	Macho reproductivo	Sendero Guacamayo	06-08-17
17	Saliva	<i>Trachops cirrhosus</i>	Carnivoro (ranas)	Macho adulto	Parque Nacional Yasuní	07-08-17

Tabla 2. Cuantificación y generación de lecturas en el secuenciador

Código	Concentración ADNc	Total de lecturas generadas	Lecturas asignadas taxonómicamente
11	11,5 ng/µl	54360	91,06%
17	11,5 ng/µl	39511	45,76%

Tabla 3. Bacterias y Eucariotas más representativos de la muestra 11

Bacteria	Lecturas	Eucariotas	Lecturas
<i>E. coli</i>	13711	<i>Plasmodium ovale</i>	35
<i>E. coli STEC</i>	1235	<i>Plasmodium halstedii</i>	12
<i>Haemophilus influenzae</i>	1066	<i>Plasmodium falciparum</i>	6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	801	<i>Toxoplasma gondii</i>	5
<i>Salmonella enterica</i>	576	<i>Plasmodium berghei</i>	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	464	<i>Babesia bovis</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	88	<i>Plasmodium chabaudi</i>	3
<i>Chlamydia trachomatis</i>	48	<i>Plasmodium vivax</i>	3
<i>Streptomyces spp</i>	34	<i>Babesia bigemina</i>	3
<i>S. pneumoniae</i>	30	<i>Trypanosoma cruzi</i>	2
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	26	<i>Trypanosoma vivax Y486</i>	2
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	19	<i>Trypanosoma theileri</i>	2
<i>Vibrio cholerae</i>	6	<i>Candida albicans</i>	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	4	<i>Malassezia sympodialis</i>	1
<i>Chlamydia abortus</i>	4	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
<i>Chlamydia psittaci</i>	3	<i>Neospora caninum</i>	1
<i>Clostridium botulinum</i>	1	<i>Leishmania donovani species complex</i>	1

Tabla 4. Bacterias y Eucariotas más representativos de la muestra 17

Bacteria	Lecturas	Eucariotas	Lecturas
<i>Chlamydia trachomatis</i>	668	<i>Plasmodium ovale</i>	53
<i>E.coli</i>	448	<i>Babesia bigemina</i>	32
<i>Haemophilus influenzae</i>	343	<i>Plasmodium berghei</i>	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	232	<i>Plasmodium falciparum</i>	9
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	165	<i>Toxoplasma gondii</i>	7
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	85	<i>Neospora caninum</i>	5
<i>Clostridium spp</i>	71	<i>Trypanosoma brucei</i>	5
<i>Streptococcus suis</i>	68	<i>Histoplasma capsulatum</i>	4
<i>Salmonella enterica</i>	61	<i>Plasmopara halstedii</i>	4
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	45	<i>Trypanosoma cruzi</i>	4
<i>Pseudomonas syringae</i>	43	<i>Plasmodium malariae</i>	3
<i>C. psittaci</i>	32	<i>Plasmodium vivax</i>	3
<i>E.coli STEC</i>	26	<i>Babesia bovis</i>	3
<i>Mycobacterium abscessus</i>	15	<i>Trypanosoma congolense</i>	3
<i>Chlamydia abortus</i>	12	<i>Dictyostelium</i>	3
<i>Vibrio anguillarum</i>	10	<i>Entamoeba invadens</i>	3
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	9	<i>Candida spp</i>	2
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	8	<i>Leishmania mexicana</i>	2
<i>Bacillus cereus</i>	6	<i>Leishmania donovani</i>	2
<i>Bacillus subtilis</i>	4	<i>Blastomyces percursus</i>	1
<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	4	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	1
<i>Vibrio cholerae</i>	2	<i>Coccidioides</i>	1

FIGURAS

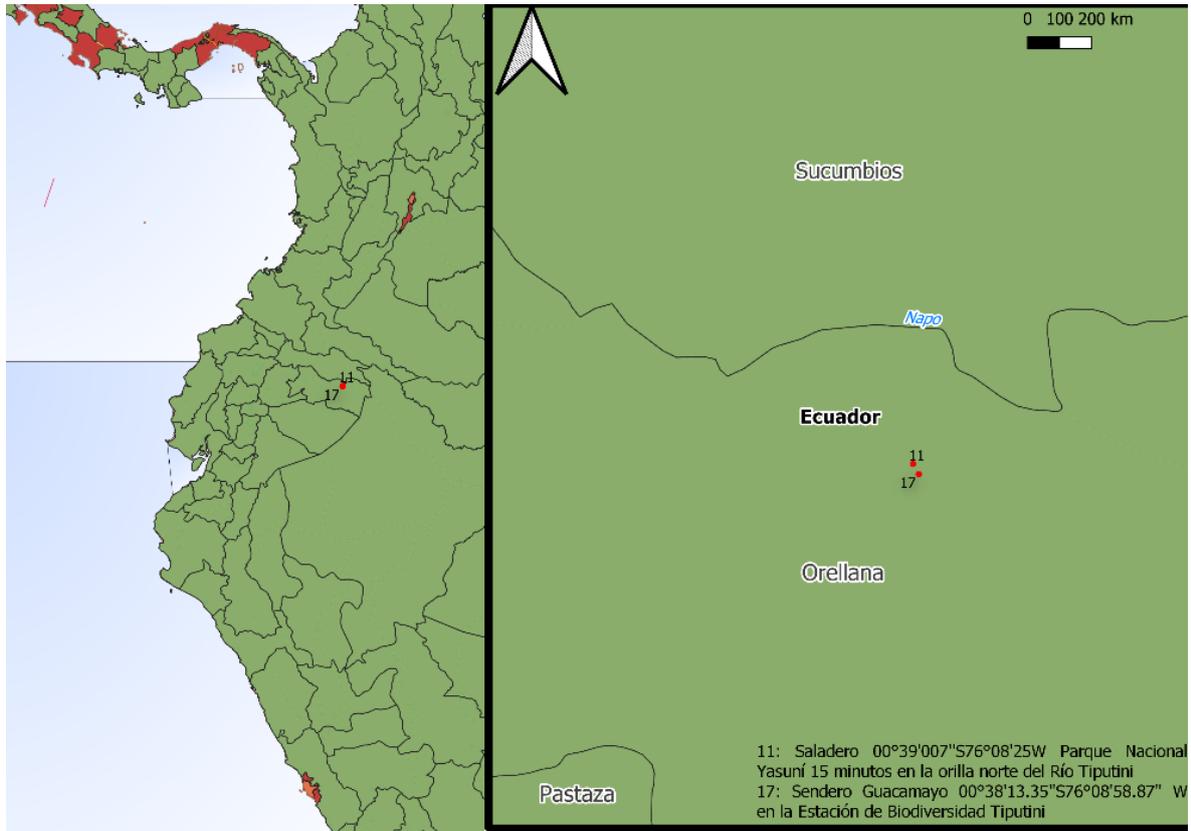


Figura 1. Sitio de recolección de muestras en el Yasuní

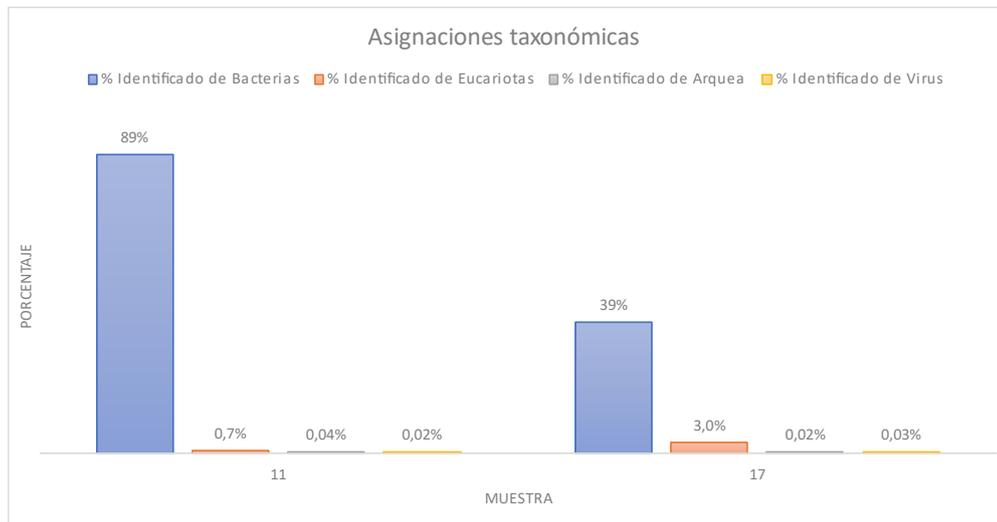


Figura 2. Porcentajes de asignación taxonómica de las lecturas en Kaiju.

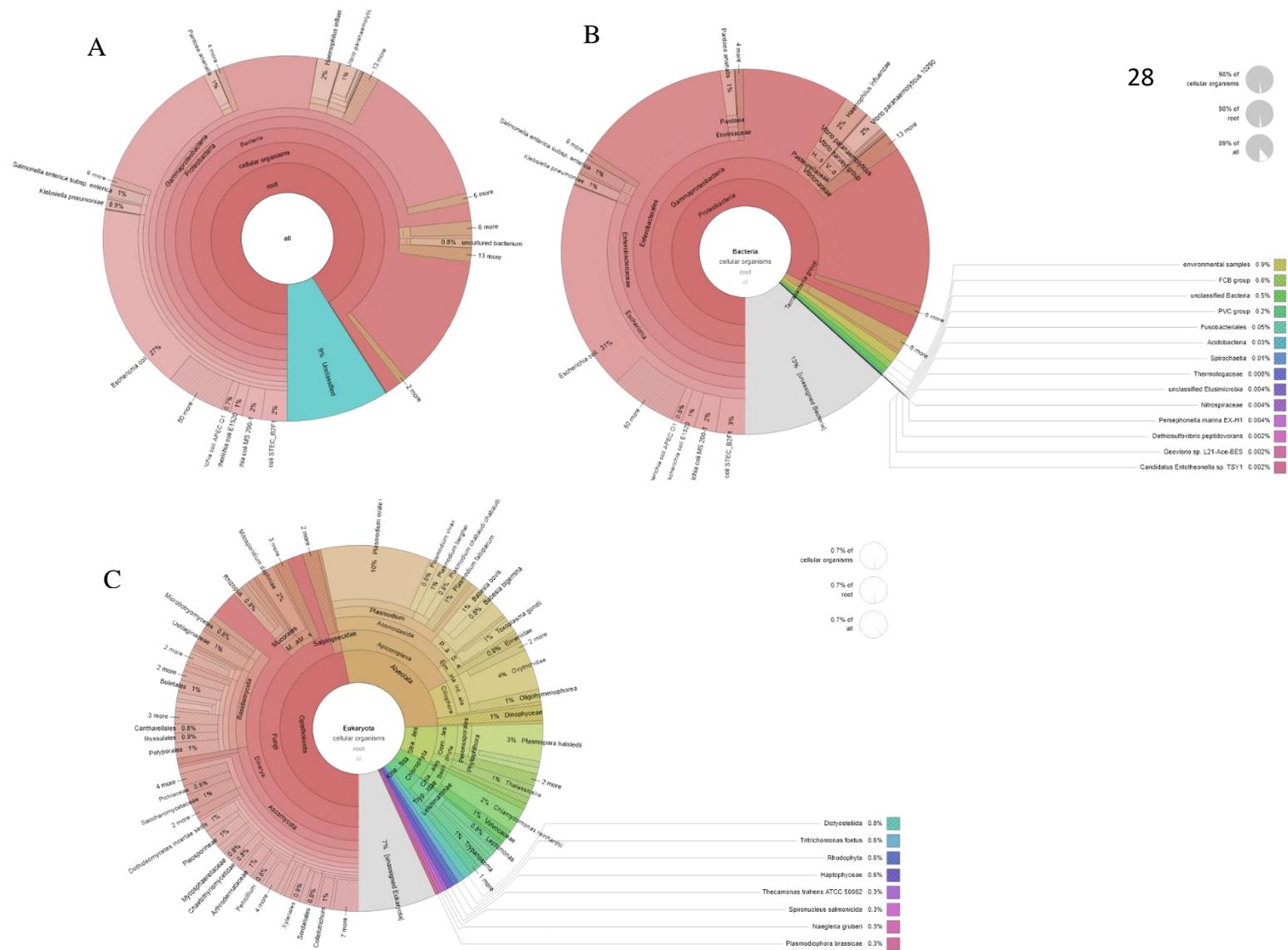


Figura 3. Krona chart de la muestra 11. A) Krona chart general, B) Krona chart de bacteria y C) Krona chart de eucariotas

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
Chlamydia trachomatis strain 231-28 complete genome	Chlamydia trachomatis	725	1450	100%	0.0	78.99%	1043207	CP006680
Chlamydia trachomatis F(Sonor3) high quality draft genome sequence	Chlamydia trachomatis F(Sonor3)	721	1442	100%	0.0	78.99%	1042789	HE693005
Chlamydia trachomatis strain 5013 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1048306	CP011745
Chlamydia trachomatis strain 5026 genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1043173	CP011744
Chlamydia trachomatis strain 5015 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1048307	CP011745
Chlamydia trachomatis strain 5009 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1048696	CP011742
Chlamydia trachomatis strain 5028 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1043346	CP011743
Chlamydia trachomatis strain 5004 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1046696	CP011746
Chlamydia trachomatis strain 5024 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1046538	CP027233
Chlamydia trachomatis strain 5014 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1431	100%	0.0	78.99%	1042578	CP021729
Chlamydia trachomatis strain 5007 chromosome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1043342	CP011743
Chlamydia trachomatis strain 5023 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1047718	CP011736
Chlamydia trachomatis strain 5008 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1431	100%	0.0	78.99%	1042567	CP011735
Chlamydia trachomatis strain 5006 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1048303	CP011732
Chlamydia trachomatis strain 5005 genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1042999	CP011734
Chlamydia trachomatis strain 5029 chromosome complete genome	Chlamydia trachomatis	719	1438	100%	0.0	78.99%	1047718	CP011731

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
Haemophilus sp. D191-1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Haemophilus sp. D191-1	1031	1031	99%	0.0	84.72%	1516	EF468822.1
Haemophilus influenzae strain NCTC4268 genome assembly chromosome_1	Haemophilus influenzae	822	4937	100%	0.0	81.18%	187886	LS593845.1
Haemophilus influenzae strain 723 complete genome	Haemophilus influenzae	822	4881	100%	0.0	81.18%	186720	CP001472.1
Haemophilus influenzae strain P665-7658 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	817	4832	100%	0.0	81.17%	1908143	CP031682.1
Haemophilus influenzae strain P636-8296 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	817	4867	100%	0.0	81.09%	1840498	CP031688.1
Haemophilus influenzae strain NCTC114346 genome assembly chromosome_1	Haemophilus influenzae	817	4904	100%	0.0	81.15%	1834484	LS458411.1
Haemophilus influenzae genome assembly NC-TC8143 chromosome_1	Haemophilus influenzae	817	4848	100%	0.0	81.09%	1890645	CP031035.1
Haemophilus influenzae strain 477 complete genome	Haemophilus influenzae	817	4845	100%	0.0	81.15%	1848259	CP007470.1
Haemophilus influenzae strain H375 complete genome	Haemophilus influenzae	817	4904	100%	0.0	81.15%	1850897	CP029810.1
Haemophilus influenzae KR594 complete genome	Haemophilus influenzae KR594	817	4898	99%	0.0	81.15%	1861176	CP029671.1
Haemophilus influenzae 86-0289P complete genome	Haemophilus influenzae 86-02	817	4865	100%	0.0	81.15%	1914490	CP000097.2
Haemophilus influenzae strain M10109 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Haemophilus influenzae	817	817	99%	0.0	81.15%	1537	AY313743.1
Haemophilus influenzae strain M10333 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Haemophilus influenzae	817	817	99%	0.0	81.15%	1537	AY313742.1
Haemophilus influenzae ATCC 9833 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Haemophilus influenzae ATCC	817	817	99%	0.0	81.15%	1499	AF224306.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
Salmonella sp. S11 chromosome complete genome	Salmonella sp. S11	898	6240	100%	0.0	85.31%	474425	CP047008
Salmonella sp. HW-130 chromosome complete genome	Salmonella sp.	876	6027	100%	0.0	85.89%	450279	CP046503
Uncultured Salmonella strain Fae004 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Salm.	856	856	98%	0.0	85.83%	1511	KM244703
Salmonella bongori strain 85-0051 chromosome complete genome	Salmonella bong.	854	5902	100%	0.0	85.44%	4487549	CP023441
Salmonella bongori strain 92-0238 chromosome complete genome	Salmonella bong.	848	5878	100%	0.0	85.31%	4472125	CP023442
Salmonella bongori strain 81-271 strain 81-0143 chromosome complete genome	Salmonella bong.	848	5858	100%	0.0	85.33%	4482540	CP023443
Salmonella enterica strain X701289 11S ribosomal RNA gene partial sequence	Salmonella enter.	846	846	99%	0.0	85.80%	892	MG663436
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	846	5889	100%	0.0	85.31%	4440004	CP029241
Salmonella enterica subsp. enterica strain T909316 11S ribosomal RNA gene partial sequence	Salmonella enter.	841	841	99%	0.0	85.80%	891	MG663435
Salmonella enterica subsp. enterica strain MF45124 11S ribosomal RNA gene partial sequence	Salmonella enter.	841	841	99%	0.0	85.80%	885	MG663438
Salmonella enterica subsp. enterica strain B491196 11S ribosomal RNA gene partial sequence	Salmonella enter.	841	841	99%	0.0	85.80%	881	MG663437
Salmonella enterica subsp. enterica strain T909316 chromosome complete genome	Salmonella enter.	839	5760	100%	0.0	85.13%	4895212	CP029240
Salmonella 16S ribosomal RNA gene complete sequence	Salmonella enter.	839	839	99%	0.0	85.15%	1541	U01295.1
Salmonella 16S ribosomal RNA gene complete sequence	Salmonella enter.	839	839	99%	0.0	85.15%	1541	U01295.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
Plasmodium ovale walkerti clone GC-5 18S ribosomal RNA gene complete sequence	Plasmodium ovale walkerti	196	196	62%	2e-49	75.25%	2021	KF596363.1
Plasmodium ovale walkerti clone GC-4 18S ribosomal RNA gene complete sequence	Plasmodium ovale walkerti	196	342	43%	6e-48	82.11%	1915	KF596361.1
Plasmodium relictum clone AN0013P clone 3 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence	Plasmodium relictum	150	150	11%	2e-33	94.77%	2020	MG504245.1
Plasmodium sp. type D 18S ribosomal RNA gene partial sequence	Plasmodium sp. type D	148	148	12%	2e-33	94.74%	1641	KF596124.1
Plasmodium yoelii isolate 285 BY 18S ribosomal RNA gene partial sequence	Plasmodium yoelii	148	148	12%	2e-33	94.74%	899	U0050510.1
Plasmodium yoelii 18S ribosomal RNA (PY27X, L249349) rRNA	Plasmodium yoelii	145	145	11%	2e-32	96.55%	2057	KJ00518889.1
Plasmodium yoelii 18S ribosomal RNA (PY27X, Q201110) partial rRNA	Plasmodium yoelii	145	145	11%	2e-32	96.55%	2057	KJ00518887.1
Plasmodium yoelii 18S ribosomal RNA (PY27X, Q602900) rRNA	Plasmodium yoelii	145	145	11%	2e-32	96.55%	2066	KJ00505592.1
Plasmodium yoelii 18S ribosomal RNA (PY27X, Q523800) rRNA	Plasmodium yoelii	145	145	11%	2e-32	96.55%	2048	KJ00265280.1
Plasmodium berghei ANKA 18S ribosomal RNA (PBANKA_0302723) rRNA	Plasmodium berghei ANKA	145	145	11%	2e-32	96.55%	2042	KJ00451495.1
Plasmodium berghei ANKA 18S ribosomal RNA (PBANKA_0622911) rRNA	Plasmodium berghei ANKA	145	145	11%	2e-32	96.55%	2067	KJ00288189.2
Plasmodium berghei ANKA 18S ribosomal RNA (PBANKA_0521221) rRNA	Plasmodium berghei ANKA	145	145	11%	2e-32	96.55%	2048	KJ00518891.1
Plasmodium knowlesi strain H 18S ribosomal RNA (PKNH_1323850) rRNA	Plasmodium knowlesi strain H	145	145	11%	2e-32	96.55%	2157	KJ00503811.1
Plasmodium knowlesi strain H 18S ribosomal RNA (PKNH_1001200) rRNA	Plasmodium knowlesi strain H	145	145	11%	2e-32	96.55%	2114	KJ00503806.1
Plasmodium knowlesi strain H 18S ribosomal RNA (PKNH_0320900) rRNA	Plasmodium knowlesi strain H	145	145	11%	2e-32	96.55%	2114	KJ00503808.1

Figura 5. Blastn de las secuencias seleccionadas de la muestra 11

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
Uncultured Chlamydia sp. 16S rRNA gene clone ID_825-9211017	uncultured Chla.	409	409	100%	2e-112	74.53%	1388	HT174411.1
Uncultured Chlamydia bacterium NS11 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Uncultured Chla.	398	398	100%	4e-109	74.49%	1407	BM069724.1
Candidatus Phlobacterium caxiflorum clone F10-272 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Candidatus Phlo.	396	396	91%	1e-108	75.09%	1064	CP0207305.1
Uncultured Chlamydia sp. 16S rRNA gene clone ID_817-9131009	uncultured Chla.	276	276	64%	2e-72	74.70%	1372	HT174409.1
Uncultured Chlamydia bacterium clone SR11 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Chla.	265	265	66%	4e-69	74.34%	986	FL085259.1
Uncultured Parachlamydia sp. clone GEGT0P01C14M1Y 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Para.	263	263	41%	2e-68	77.99%	476	HQ045206.1
Uncultured Chlamydia bacterium clone obgp. Chlamydia_373 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Chla.	259	259	37%	2e-67	78.77%	427	KP076094.1
Uncultured Chlamydia bacterium clone obgp. Chlamydia_490 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Chla.	246	246	37%	2e-63	78.25%	426	KP076171.1
Uncultured Chlamydia bacterium clone obgp. Chlamydia_449 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Chla.	243	243	31%	2e-62	80.17%	427	KP076167.1
Uncultured Chlamydia bacterium clone obgp. Chlamydia_345 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Chla.	237	237	34%	9e-61	78.85%	427	KP076066.1
Uncultured Chlamydia bacterium clone obgp. Chlamydia_18 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Chla.	237	237	31%	9e-61	79.89%	427	KP076138.1
Uncultured Chlamydia bacterium clone JAURON_C2 clone 16S ribosomal RNA gene partial sequence	uncultured Chla.	237	237	32%	9e-61	79.34%	438	EF375705.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
Haemophilus influenzae strain P673-7668 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	829	3110	100%	1e-148	76.87%	183290	CP031683.1
Haemophilus influenzae CGH8242602 complete genome	Haemophilus influenzae CGH82426	829	3468	100%	1e-148	76.95%	181180	CP031685.1
Haemophilus influenzae strain SP5811 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	825	3114	100%	5e-147	76.84%	188641	CP031686.1
Haemophilus influenzae strain SP2911 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	823	3114	100%	5e-147	76.84%	188649	CP031687.1
Haemophilus influenzae R2866 complete genome	Haemophilus influenzae R2866	823	2998	100%	5e-147	76.86%	193200	CP031689.1
Haemophilus influenzae isolate arypidus strain HE07F3052 chromosome complete g.	Haemophilus influenzae isolate arypidus	820	2963	100%	1e-146	76.79%	187864	CP031690.1
Haemophilus influenzae isolate arypidus strain HE07F3051 chromosome complete g.	Haemophilus influenzae isolate arypidus	818	3001	100%	2e-145	76.79%	2000194	CP031691.1
Haemophilus influenzae strain P602-8883 chromosome	Haemophilus influenzae	818	3414	100%	2e-145	76.79%	184393	CP031692.1
Haemophilus influenzae strain P616-7189 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3088	100%	2e-145	76.79%	190431	CP031693.1
Haemophilus influenzae strain P614-8342 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3109	100%	2e-145	76.79%	184843	CP031694.1
Haemophilus influenzae strain P615-8618 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3042	100%	2e-145	76.79%	184000	CP031695.1
Haemophilus influenzae strain P616-2514 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3109	100%	2e-145	76.79%	185860	CP031696.1
Haemophilus influenzae strain P617-9224 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3109	100%	2e-145	76.79%	158420	CP031697.1
Haemophilus influenzae strain P618-8296 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3109	100%	2e-145	76.79%	184048	CP031698.1
Haemophilus influenzae strain P619-4399 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3109	100%	2e-145	76.79%	189731	CP031699.1
Haemophilus influenzae strain P623-2793 chromosome complete genome	Haemophilus influenzae	818	3109	100%	2e-145	76.79%	185864	CP031700.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
Salmonella sp. S23 chromosome complete genome	Salmonella sp. S23	1373	9427	100%	0.0	91.19%	4942736	CP046933.1
Salmonella sp. S13 chromosome complete genome	Salmonella sp. S13	1343	9405	100%	0.0	90.79%	4744255	CP047008.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1334	9173	100%	0.0	90.54%	4147338	CP029240.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1334	9150	100%	0.0	90.54%	4147033	CP029241.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1334	9156	100%	0.0	90.41%	4199045	CP029242.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1332	9195	100%	0.0	90.53%	4931277	CP046936.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1330	9194	100%	0.0	90.50%	4922096	CP046937.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1328	9099	100%	0.0	90.50%	4173176	CP046938.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1328	9232	100%	0.0	90.38%	4758764	CP046939.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1328	9216	100%	0.0	90.31%	4895443	CP029222.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1327	9094	100%	0.0	90.42%	4893742	CP029247.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1327	9081	100%	0.0	90.43%	4976023	CP029219.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1327	9218	100%	0.0	90.44%	5121989	CP046940.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1327	9218	100%	0.0	90.44%	4919346	CP046941.1
Salmonella enterica subsp. enterica strain 04-0440 chromosome complete genome	Salmonella enter.	1327	9128	100%	0.0	90.42%	48445	

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, E., Gugsu, G., & Ahmed, M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. In *Journal of Tropical Medicine* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/4674235>
- Allocati, N., Petrucci, A. G., Di Giovanni, P., Masulli, M., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. (2016). Bat-man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discovery*, 2, 16048. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.48>
- Bachmann, N. L., Polkinghorne, A., & Timms, P. (2014). Chlamydia genomics: Providing novel insights into chlamydial biology. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 8, pp. 464–472). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.013>
- Barr, J., Todd, S., Cramer, G., Foord, A., Marsh, G., Frazer, L., Payne, J., Harper, J., Baker, K. S., Cunningham, A. A., Wood, J. L. N., Middleton, D., & Wang, L. F. (2018). Animal infection studies of two recently discovered African bat paramyxoviruses, Achimota 1 and Achimota 2. *Scientific Reports*, 8(1), 12744. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31193-z>
- Bass, M. S., Finer, M., Jenkins, C. N., Kreft, H., Cisneros-Heredia, D. F., McCracken, S. F., Pitman, N. C. A., English, P. H., Swing, K., Villa, G., Di Fiore, A., Voigt, C. C., & Kunz, T. H. (2010). Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PLoS ONE*, 5(1), e8767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008767>
- Bergner, L. M., Orton, R. J., da Silva Filipe, A., Shaw, A. E., Becker, D. J., Tello, C., Biek, R., & Streicker, D. G. (2019). Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 128–143. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12946>
- Bonilla-Aldana, D. K., Jimenez-Diaz, S. D., Arango-Duque, J. S., Aguirre-Florez, M., Balbin-Ramon, G. J., Paniz-Mondolfi, A., Suárez, J. A., Pachar, M. R., Perez-Garcia, L. A., Delgado-Noguera, L. A., Sierra, M. A., Muñoz-Lara, F., Zambrano, L. I., & Rodriguez-Morales, A. J. (2021). Bats in ecosystems and their Wide spectrum of viral infectious potential threats: SARS-CoV-2 and other emerging viruses. In *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 102, pp. 87–96). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.050>
- Bouma, H. R., Carey, H. V., & Kroese, F. G. M. (2010). Hibernation: the immune system at rest? *Journal of Leukocyte Biology*, 88(4), 619–624. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310174>
- de Assis, G. M. P., de Alvarenga, D. A. M., Costa, D. C., de Souza Junior, J. C., Hirano, Z. M. B., Kano, F. S., de Sousa, T. N., & de Brito, C. F. A. (2016). Detection of Plasmodium in faeces of the new world primate Alouatta clamitans. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(9), 570–576. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160222>
- Dietrich, M., Kearney, T., Seamark, E. C. J., Paweska, J. T., & Markotter, W. (2018). Synchronized shift of oral, faecal and urinary microbiotas in bats and natural infection dynamics during seasonal reproduction. *Royal Society Open Science*, 5(5). <https://doi.org/10.1098/rsos.180041>

- Franco Filho, L. C., Barata, R. R., Cardoso, J. F., Massafra, J. M. de V., Lemos, P. da S., Casseb, L. M. N., Cruz, A. C. R., & Nunes, M. R. T. (2019). Metagenomic Analysis of Samples from Three Bat Species Collected in the Amazon Rain Forest. *Microbiology Resource Announcements*, 8(2), e01422-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01422-18>
- Fritschi, J., Fritschi, J., Marti, H., Marti, H., Seth-Smith, H. M. B., Aeby, S., Greub, G., Meli, M. L., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., Hofmann-Lehmann, R., Mühldorfer, K., Stokar-Regenscheit, N., Wiederkehr, D., Pilo, P., Van Den Broek, P. R., Borel, N., & Borel, N. (2020). Prevalence and phylogeny of Chlamydiae and hemotropic mycoplasma species in captive and free-living bats. *BMC Microbiology*, 20(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01872-x>
- Galen, S. C., Borner, J., Martinsen, E. S., Schaer, J., Austin, C. C., West, C. J., & Perkins, S. L. (2018). The polyphyly of Plasmodium: Comprehensive phylogenetic analyses of the malaria parasites (Order Haemosporida) reveal widespread taxonomic conflict. *Royal Society Open Science*, 5(5). <https://doi.org/10.1098/rsos.171780>
- Greninger, A. L., & Naccache, S. N. (2019). Metagenomics to Assist in the Diagnosis of Bloodstream Infection. In *The journal of applied laboratory medicine* (Vol. 3, Issue 4, pp. 643–653). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.026120>
- Greninger, A. L., Naccache, S. N., Federman, S., Yu, G., Mbala, P., Bres, V., Stryke, D., Bouquet, J., Somasekar, S., Linnen, J. M., Dodd, R., Mulembakani, P., Schneider, B. S., Muyembe-Tamfum, J. J., Stramer, S. L., & Chiu, C. Y. (2015). Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Medicine*, 7(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0220-9>
- Han, H. J., Wen, H. ling, Zhou, C. M., Chen, F. F., Luo, L. M., Liu, J. wei, & Yu, X. J. (2015). Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. In *Virus Research* (Vol. 205, pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.05.006>
- Hayman, D. T. S. (2019). Bat tolerance to viral infections. *Nature Microbiology*, 4(5), 728–729. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0430-9>
- Hilbert, F., Smulders, F. J. M., Chopra-Dewasthaly, R., & Paulsen, P. (2012). Salmonella in the wildlife-human interface. In *Food Research International* (Vol. 45, Issue 2, pp. 603–608). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.015>
- Hokynar, K., Vesterinen, E. J., Lilley, T. M., Pulliainen, A. T., Korhonen, S. J., Paavonen, J., & Puolakkainen, M. (2017). Molecular evidence of Chlamydia-like organisms in the feces of *Myotis daubentonii* bats. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.02951-16>
- Hu, D., Zhu, C., Wang, Y., Ai, L., Yang, L., Ye, F., Ding, C., Chen, J., He, B., Zhu, J., Qian, H., Xu, W., Feng, Y., Tan, W., & Wang, C. (2017). Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11384-w>
- Irving, A. T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D. E., & Wang, L. F. (2021). Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. In *Nature* (Vol. 589, Issue 7842, pp. 363–370). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>

- Kafetzopoulou, L. E., Efthymiadis, K., Lewandowski, K., Crook, A., Carter, D., Osborne, J., Aarons, E., Hewson, R., Hiscox, J. A., Carroll, M. W., Vipond, R., & Pullan, S. T. (2018). Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples. *Eurosurveillance*, *23*(50), 1800228. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.50.1800228>
- Leggett, R. M., Alcon-Giner, C., Heavens, D., Caim, S., Brook, T. C., Kujawska, M., Martin, S., Peel, N., Axford-Palmer, H., Hoyles, L., Clarke, P., Hall, L. J., & Clark, M. D. (2020). Rapid MinION profiling of preterm microbiota and antimicrobial-resistant pathogens. *Nature Microbiology*, *5*(3), 430–442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0626-z>
- Lei, M., & Dong, D. (2016). Phylogenomic analyses of bat subordinal relationships based on transcriptome data. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep27726>
- Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Mohsin, H., Asif, A., Fatima, M., & Rehman, Y. (2020). Potential role of viral metagenomics as a surveillance tool for the early detection of emerging novel pathogens. In *Archives of Microbiology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02105-5>
- Mühldorfer, K. (2013). Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses and Public Health*, *60*(1), 93–103. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x>
- Mühldorfer, K., Speck, S., & Wibbelt, G. (2014). Proposal of *Vespertiliibacter pulmonis* gen. nov., sp. nov. and two genomospecies as new members of the family Pasteurellaceae isolated from European bats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(PART 7), 2424–2430. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062786-0>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2014). *Microbiología médica*. Elsevier.
- Pilloux, L., Aeby, S., Gäumann, R., Burri, C., Beuret, C., & Greub, G. (2015). The high prevalence and diversity of Chlamydiales DNA within *Ixodes ricinus* ticks suggest a role for ticks as reservoirs and vectors of Chlamydia-related bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(23), 8177–8182. <https://doi.org/10.1128/AEM.02183-15>
- Plowright, R. K., Eby, P., Hudson, P. J., Smith, I. L., Westcott, D., Bryden, W. L., Middleton, D., Reid, P. A., McFarlane, R. A., Martin, G., Tabor, G. M., Skerratt, L. F., Anderson, D. L., Cramer, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L. F., Epstein, J. H., ... McCallum, H. (2014). Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 282, Issue 1798). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2124>
- Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Ievy, S., Hossain, M. J., Zowalaty, M. E. E., Rahman, A. M. M. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. *Microorganisms*, *8*(9), 1–34.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>

Rrwick. (2018). *GitHub-Porechop: adapter trimmer for Oxford Nanopore reads*.
<https://github.com/rrwick/Porechop#license>

Tirira, D., Brito, J., Burneo, S., & Comisión de Diversidad de la AEM. (2020). *Mamíferos del Ecuador: lista actualizada de especies / Mammals of Ecuador: Updated checklist species. Versión 2020.1*. Asociación Ecuatoriana de Mastozoología.

Veikkolainen, V., Vesterinen, E. J., Lilley, T. M., & Pulliainen, A. T. (2014). Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), 960–967. <https://doi.org/10.3201/eid2006.130956>

Wang, L. F., & Anderson, D. E. (2019). Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 34, pp. 79–89). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.007>

Wang, L. F., & Cowled, C. (2015). Bats and Viruses. In L.-F. Wang & C. Cowled (Eds.), *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118818824>

ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODO SISPA

Ronda A (primera hebra)	Volumen (μ l)
RNA	4
Sol-Primer A (40pmol/ μ l) 5'-GTTTCCCACTGGAGGATA-N ₉ -3'	1
5X Buffer de primera hebra	2
Agua libre de nucleasas	1
10mM dNTPs	1
0.1mM DTT	0.5
Enzima Superscript III RT	0.5
Ronda A (segunda hebra)	Volumen (μ l)
Síntesis de primera hebra	10
Agua libre de nucleasas	3.85
5X Sequenase Buffer	1
Enzima Sequenase	0.15
Ronda B	Volumen (μ l)
Agua libre de nucleasas	35
<i>SISPA Round A Product</i>	5
10X Accutaq Reaction Mix	5
Sol-Primer B (100pmol/ μ l) (5'-GTTTCCCACTGGAGGATA-3')	1
Dimetilsulfóxido	1
10mM dNTPs	2.5
Accutaq polimerasa	0.5

ANEXO 2: PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS

Reparación y End-prep	Volumen (μ l)
ADNc	48
NEBNext FFPE DNA Repair Buffer	3.5
Ultra II End-prep reaction buffer	3.5
Ultra II End-prep enzyme mix	3
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	2
Ligación de barcodes	Volumen (μ l)
500 ng end-prepped ADNc	22.5
Native Barcode	2.5
Blunt/TA Ligasa Master Mix	25
Ligación de adaptadores	Volumen (μ l)
700 ng ADNc	65
Adapter Mix II (AMII)	5
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	20
Quick T4 DNA Ligase	10
Carga de librerías	Volumen (μ l)
Sequencing Buffer (SQB)	37.5
Loading Beads (LB)	25.5
Librería de ADNc	12