



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Identificación de la polimerasa viral (gen L) de virus
de la familia *Paramyxoviridae* en muestras de
Murciélagos”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

MARIA GUADALUPE OROZCO AVALOS

ASESORA: DRA. JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO

COASESORA: DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de la polimerasa viral (gen L) de virus de la familia Paramyxoviridae en muestras de Murciélagos.

Que presenta la pasante: María Guadalupe Orozco Avalos

Con número de cuenta: 306295254 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Marzo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Nydia Berenice González Angeles	
1er. SUPLENTE	QFB. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

DEDICATORIA

A MI PADRE

Gracias por tu apoyo y paciencia a lo largo de mi vida, que con tu esfuerzo y sacrificio hiciste posible que logrará culminar mis estudios universitarios.

A MIS HERMANAS

Adriana, Yolanda y Leticia. Mis grandes compañeras de vida quienes siempre me han apoyado incondicionalmente; han sido mi guía a lo largo de mi camino, muchos de mis logros se los debo a ustedes.

A MIS CUÑADOS

Por su gran apoyo.

A MIS SOBRINOS

Por ser una de mis grandes motivaciones.

A MI MADRINA

Por sus consejos y apoyo.

A LA MEMORIA DE MI MADRE †

Finalmente a Guadalupe

Que a pesar de las dificultades durante este proceso; con paciencia, confianza y esfuerzo logró culminar una de sus metas.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) la que fue mi casa de estudios durante mi formación académica.

Al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A los laboratorios de Epizootiología y Virología del CENID-Microbiología, INIFAP, México.

A la Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero por haberme recibido como parte de su equipo de trabajo durante estos años, por el apoyo y paciencia que me brindo durante la realización de la tesis. Agradezco los consejos y conocimientos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira por su apoyo durante el servicio social y tesis.

Al Dr. Francisco Rivera Benítez por los recursos y asesoría brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Jazmín De la Luz por la asesoría brindada.

Al MVZ. Diego por ayudarme en la realización de la prueba de inmunoperoxidasa.

A la M.C Virginia Benítez Solís a quien le agradezco el apoyo brindado durante mi formación académica.

A mis amigos de la FESC por haber formado parte de este gran trayecto, gracias a ustedes la estancia en la facultad resulto más amena.

Finalmente le agradezco a Dios y a la vida por haberme permitido finalizar una meta; con la fortuna de haber conocido a grandes personas a lo largo del camino.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Epizootiología del Centro de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE CUADROS	XI
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 ORDEN CHIROPTERA	2
1.1.1 Características y Agrupación	2
1.1.2 ¿Cómo se pueden diferenciar los murciélagos?	3
1.1.3 Alimentación e Importancia	3
1.2 VIRUS RELACIONADOS CON MURCIÉLAGOS	4
1.3 FAMILIA <i>PARAMYXOVIRIDAE</i>	6
1.3.1 Clasificación	6
1.3.2 Genoma viral	6
1.3.3 Ciclo biológico	7
1.3.4 Polimerasa viral (gen L)	8
1.3.5 Paramixovirus en murciélagos	10
1.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO VIRAL	11
1.4.1 Aislamiento viral	11
1.4.2 Hemaglutinación (HA)	12
1.4.3 Ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)	12
1.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	12
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17
5. METODOLOGÍA	18

5.1 Diagrama general	18
5.2 Muestras	19
5.3 Extracción y cuantificación de RNA	21
5.4 Síntesis de DNA (cadena complementaria cDNA)	22
5.5 Identificación del gen de control interno β -actina mediante RT-PCR	22
5.6 PCR semi-anidada (identificación de subfamilia y género)	24
5.7 Aislamiento viral	26
5.7.1 Cultivo en línea celular VERO	27
5.7.2 Amplificación de un fragmento del gen L de los aislamientos	27
5.7.3 Purificación de los productos de PCR	29
5.7.4 Secuenciación de los productos de PCR	29
5.7.5 Análisis bioinformático de las secuencias	30
5.8 Detección de anticuerpos mediante la prueba IPMA	30
6. RESULTADOS	31
6.1 Identificación del gen de control interno beta-actina (β -actina)	31
6.2 PCR semi-anidada (identificación de subfamilia y género)	32
6.3 Aislamiento viral	37
6.3.1 Prueba de hemaglutinación (HA)	38
6.3.2 RT-PCR y PCR semi-anidada para muestras aisladas en células VERO	38
6.3.3 Amplificación de la polimerasa y secuenciación de los productos de PCR procedentes del aislamiento	40
6.3.4 Análisis bioinformático de las secuencias	42
6.4 IPMA	46
7. DISCUSIÓN	48
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	53
10. REFERENCIAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

®	Marca registrada
TM	Trademark (Marca comercial)
©	Compañía
[]	Concentración
(p/v)	Relación peso/volumen
β-actina	Beta-actina
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
RNAm	Messenger-RNA (Ácido ribonucleico mensajero)
cDNA	Cadena complementaria de DNA
CDV	Canine Distemper Virus (Distemper)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio de cultivo modificado por Dulbeco)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
DGVS	Dirección General de Vida Silvestre
IPMA	Inmunoperoxidase Monolayer Assay (Ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa)
Kb	Kilobases
L	Proteína de alto peso molecular
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
μL	Microlitro
PAC	Producción Animal Cerdos
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (Buffer fosfato salino)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PK15	Células de riñón de cerdo
PorPV	Rubulavirus Porcino
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Reverse Transcription (Transcriptasa reversa)
VERO	Células renales de mono verde africano
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
V	Voltios

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma viral de diferentes miembros de la familia <i>Paramyxoviridae</i>	7
Figura 2. Ciclo biológico de los paramixovirus	8
Figura 3. Dominios y sitios de mutación en la proteína L	9
Figura 4. Proceso esquematizado de la PCR	13
Figura 5. Diagrama de la PCR semi-anidada realizada en este trabajo	15
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de la amplificación del gen β -actina de muestras de murciélagos	32
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados mediante PCR semi-anidada (primer etapa) para la identificación de subfamilia <i>Paramyxovirinae</i> en muestras de murciélagos	33
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados mediante PCR semi-anidada (segunda etapa) para la identificación de subfamilia <i>Paramyxovirinae</i> en muestras de murciélagos	34
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados mediante PCR semi-anidada (primer etapa) para la identificación de género <i>Avulavirus-Rubulavirus</i> en muestras de murciélagos	35
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados mediante PCR semi-anidada (segunda etapa) para la identificación de género <i>Avulavirus-Rubulavirus</i> en muestras de murciélagos	36
Figura 11. Murciélago frugívoro 41 <i>Sturnira lilium</i>	37
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de la amplificación del gen β -actina de las muestras aisladas en células VERO del murciélago frugívoro 41 <i>Sturnira lilium</i>	38
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados mediante PCR semi-anidada para la identificación de	39

subfamilia y género de las muestras aisladas en células VERO del murciélago frugívoro 41 *Sturnira lilium*

Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados mediante PCR para la identificación del gen L de las muestras aisladas en células VERO del murciélago frugívoro 41 *Sturnira lilium* **41**

Figura 15. Alineamiento de las secuencias obtenidas **42**

Figura 16. Análisis del alineamiento derivado de una porción de la proteína L (630 aminoácidos) de las muestras aisladas en células VERO del murciélago frugívoro 41 *Sturnira lilium* comparado con el virus de referencia LPMV **45**

Figura 17. Análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos derivada de un fragmento de la proteína L **46**

Figura 18. Detección de anticuerpos específicos contra PorPV mediante el ensayo IPMA en células PK15 de sueros de murciélagos **47**

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Virus identificados en murciélagos, clasificados de acuerdo a familia y género	5
Cuadro 2. Clasificación de las muestras analizadas	20
Cuadro 3. Mezcla de reacción para la amplificación de β -actina	23
Cuadro 4. Iniciadores usados en la amplificación de β -actina	23
Cuadro 5. Mezcla de reacción para la primer etapa de la PCR semi-anidada (identificación de la subfamilia <i>Paramyxovirinae</i>)	24
Cuadro 6. Mezcla de reacción para la segunda etapa de la PCR semi-anidada (identificación de la subfamilia <i>Paramyxovirinae</i>)	25
Cuadro 7. Iniciadores consenso y degenerados utilizados en la identificación de paramixovirus	26
Cuadro 8. Mezcla de reacción para la amplificación de un fragmento del gen L mediante PCR	28
Cuadro 9. Iniciadores usados para la amplificación de un fragmento gen L mediante PCR	28
Cuadro 10. Resultados de la PCR semi-anidada para la identificación de subfamilia y género	33

RESUMEN

La familia *Paramyxoviridae* incluye diversos virus que afectan a humanos y animales; estudios recientes han confirmado la presencia de estos virus en murciélagos de diferentes regiones del mundo. El presente trabajo tuvo como objetivo detectar la presencia de virus de la familia *Paramyxoviridae* en murciélagos de diferentes especies mediante la técnica de RT-PCR semi-anidada. En este estudio se utilizaron iniciadores específicos para la detección de la polimerasa viral (gen L) de virus pertenecientes a la subfamilia *Paramyxovirinae* géneros *Avulavirus*, *Rubulavirus*, *Respirovirus*, *Morbilivirus* y *Henipavirus*. Se trabajaron un total de 34 muestras de RNA obtenidas a partir de cerebro de murciélagos; de las cuales 27 muestras fueron seleccionadas mediante la detección del gen interno de control constitutivo β -actina por la técnica de RT-PCR; seis (22%) de éstas fueron detectadas positivas por PCR para la subfamilia *Paramyxovirinae* y once (41%) para género *Avulavirus-Rubulavirus*, mismas que resultaron negativas para género *Respirovirus*, *Morbilivirus* y *Henipavirus*. Se logró el aislamiento de un virus positivo a género *Avulavirus-Rubulavirus* en línea celular VERO con actividad hemaglutinante, proveniente de cerebro, pulmón y riñón de un murciélago frugívoro (*Sturnira lilium*). El aislamiento viral fue confirmado por la detección de la polimerasa viral (gen L) mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de aproximadamente 2835 pb del gen L, identificando el segmento “GDNQ” que corresponde a una secuencia de aminoácidos altamente conservada en virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*.

Este trabajo aporta información relevante ya que demuestra la circulación de virus de la subfamilia *Paramyxovirinae* en murciélagos frugívoros de México, lo que representa un factor de riesgo importante dado que recientemente los murciélagos se han asociado a enfermedades emergentes de importancia epidemiológica a nivel mundial; siendo la técnica de PCR semi-anidada una buena opción para la detección de nuevos y conocidos virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*.

1. INTRODUCCIÓN

Diversos aspectos biológicos, ecológicos y evolutivos han sido importantes en la identificación de virus en murciélagos (Moratelli & Calisher, 2015). Actualmente más de 200 virus representantes de 27 familias han sido aislados o detectados en murciélagos, muchos de ellos zoonóticos (Calisher, 2015).

1.1 ORDEN CHIROPTERA

Los quirópteros comúnmente llamados murciélagos están taxonómicamente agrupados en el orden *Chiroptera*, representando un 20% de todas las especies de mamíferos (Bergillos & Rivas, 2013). Los quirópteros ocupan el segundo lugar después de los roedores en la riqueza de especies con más de 1300, agrupadas actualmente en 20 familias y 175 géneros (Fenton, 2015).

Existen dos subórdenes: Megachiroptera y Microchiroptera. Los megaquirópteros se encuentran localizados en el viejo mundo y Oceanía, ausentes en el Continente Americano en comparación con los microquirópteros presentes en todos los continentes.

1.1.1 Características y Agrupación

Los murciélagos son mamíferos placentarios, vertebrados; animales nocturnos con capacidad de vuelo; utilizan un sistema de orientación llamado ecolocación (microquirópteros) y buen sentido de la visión (megaquirópteros) para ir en busca de sus alimentos, permanecen la mayor parte del día en refugios; su promedio de vida es mayor a 30 años.

Habitan en casi todo tipo de climas a excepción de zonas polares; por lo que existe una mayor concentración en zonas tropicales ocupando huecos de cuevas, minas, troncos, edificios, entre otros; se encuentran agrupados en colonias (Moratelli &

Calisher, 2015). El número de murciélagos en una colonia depende de la disponibilidad de alimento, espacio y condiciones climáticas.

1.1.2 ¿Cómo se pueden diferenciar los murciélagos?

Por su gran diversidad de especies, los murciélagos se pueden clasificar con base en las siguientes características (Cuevas & Morales, 2016):

- Tamaño
- Color de pelo
- Forma de las orejas
- Forma de la nariz
- Tipo de dentadura
- Forma de labio inferior
- Forma de la lengua
- Presencia o ausencia de cola
- Características del dedo pulgar
- Tipo de alimentación
- Ecolocación

1.1.3 Alimentación e Importancia

Los murciélagos presentan diversidad en la dieta, se clasifican en 8 categorías: comedores de fruta, alimentadores de flores, insectívoros aéreos, insectívoros de suelo, carnívoros, consumidores de pescado, los que se alimentan de sangre y omnívoros (Wilson, 1973). El tipo de alimentación de los murciélagos ha sido un aspecto relevante en ecología, veterinaria y salud pública. Aunque es poca la

información acerca de ellos, se sabe de su importancia en el balance del ecosistema tropical; los murciélagos que se alimentan de insectos consumen diariamente un número importante de ellos, de este modo pueden controlar de forma natural la excesiva población de insectos. Los frugívoros permiten la diseminación de semillas de plantas; los que se alimentan de néctar de las flores cumplen la función de polinizadores; además del uso de guano como fertilizante.

Algunos estudios mencionan que características como: alimentación, naturaleza colonial, estructura de la población, capacidad de vuelo, migración, hibernación, tiempo de vida, y susceptibilidad los ha hecho anfitriones a diversos patógenos, entre ellos los virus (Calisher *et al*, 2006) siendo capaces de transmitir el virus a humanos y animales sin presentar la enfermedad.

1.2 VIRUS RELACIONADOS CON MURCIÉLAGOS

Algunos virus de gran importancia relacionados con murciélagos se mencionan a continuación (Cuadro 1). El virus de la rabia aislado de un vampiro común (*Desmodus rotundus*) en 1931 (Baer, 1991), además del reporte del primer caso de rabia en un murciélago de Pensilvania en 1953 (Witte, 1954). El SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo) virus que provocó más de 4000 casos y 250 muertes en más de 25 países a finales de 2003. Los laboratorios de Estados Unidos, Alemania y Hong Kong aislaron el virus de pacientes con SARS clasificándolo dentro la familia *Coronaviridae*. Aunque la fuente en la naturaleza no se había determinado, fue hasta 2005 en un estudio retrospectivo de muestras de murciélagos utilizadas para otros fines en las que se detectó un coronavirus estrechamente relacionado con el brote del SARS (Lau *et al*, 2005). El MERS (Síndrome Respiratorio de Oriente Medio) provocó hasta el año 2015 956 casos incluyendo 351 muertes. Por ser un coronavirus similar al virus SARS, se consideró la relación de este virus con los murciélagos, llevándose a cabo una serie de investigaciones que concluyó en la identificación de una secuencia parcial de RNA de un betacoronavirus en una muestra fecal de un murciélago en Arabia Saudita (Memish *et al*, 2013). El virus Ébola y Marbug son parte de los mononegavirales

clasificados dentro de la familia *Filoviridae*, causantes de enfermedades hemorrágicas graves y mortales en humanos y primates. Debido a que se ha demostrado que los murciélagos albergan varios filovirus y que pueden ser utilizados como fuente de proteína por primates no humanos, se considera que esto puede dar como resultado la transmisión del virus. Estudios en 2001 y 2003 analizaron pequeños vertebrados en los sitios donde primates habían muerto cerca de la Frontera de Gabón y en la República del Congo detectándose RNA de un ebolavirus en murciélagos frugívoros. Las secuencias de estos virus fueron similares a las del ebolavirus aislado de humanos durante el brote de Zaire en 1976, además de la detección de anticuerpos mediante análisis serológico (Leroy *et al*, 2005).

Recientemente nuevas enfermedades emergentes han sido asociadas a la presencia de virus de la familia *Paramyxoviridae*, ejemplo de ellos: virus Menangle (MeV), Mapuera (MPRV), Rubulavirus porcino (PorPV), Hendra (HeV), Nipah (NiV), entre otros. Existen reportes donde se han identificado aproximadamente 66 virus en murciélagos pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae* (Drexler *et al*, 2012).

Cuadro 1. Virus identificados en murciélagos, clasificados de acuerdo a familia y género (Calisher, 2015)

Familia	Género	Virus
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	Virus de la rabia
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	Influenza tipo A
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Henipavirus</i>	Virus Hendra Virus Nipah
	<i>Rubulavirus</i>	Mapuera, Menangle Tioman
	Indeterminado	Virus parainfluenza
<i>Coronaviridae</i>		SARS, MERS
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Virus del Chinkungunya
<i>Picornaviridae</i>	Indeterminado	Virus Juruaca
<i>Herpesviridae</i>	Indeterminado	Citomegalovirus A Virus Parixa
<i>Arenaviridae</i>		Virus Tacaribe
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Virus Jugra Virus Rio Bravo Virus Saboya
No clasificado		Virus Yogue

1.3 FAMILIA PARAMYXOVIRIDAE

La familia *Paramyxoviridae* incluye virus que afectan a humanos y animales tales como el Virus del Sarampión, Virus de las paperas, Parainfluenza, Newcastle, Virus Sincitial Respiratorio Humano, además de los virus emergentes Hendra y Nipah (Cox & Plemper, 2015).

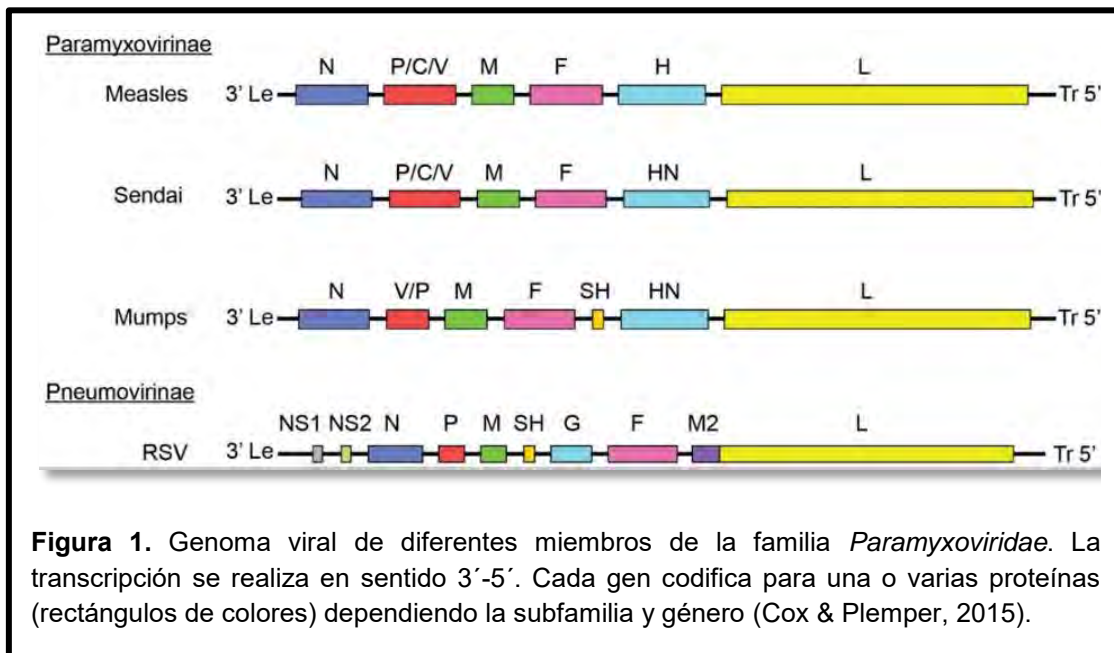
Los paramixovirus son microorganismos pleomórficos con un genoma viral de tipo RNA lineal, polaridad negativa, monocatenario y no segmentado de unas 15 kb de tamaño.

1.3.1 Clasificación

La familia *Paramyxoviridae* se clasifica en dos subfamilias y 7 géneros. La primera subfamilia es la *Paramyxovirinae* (Paramixovirus) dividida en 5 géneros: *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Respirovirus*, *Henipavirus* y *Morbilivirus*; la segunda subfamilia *Pneumovirinae* en los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus* (Wang, et al. 2011).

1.3.2 Genoma viral

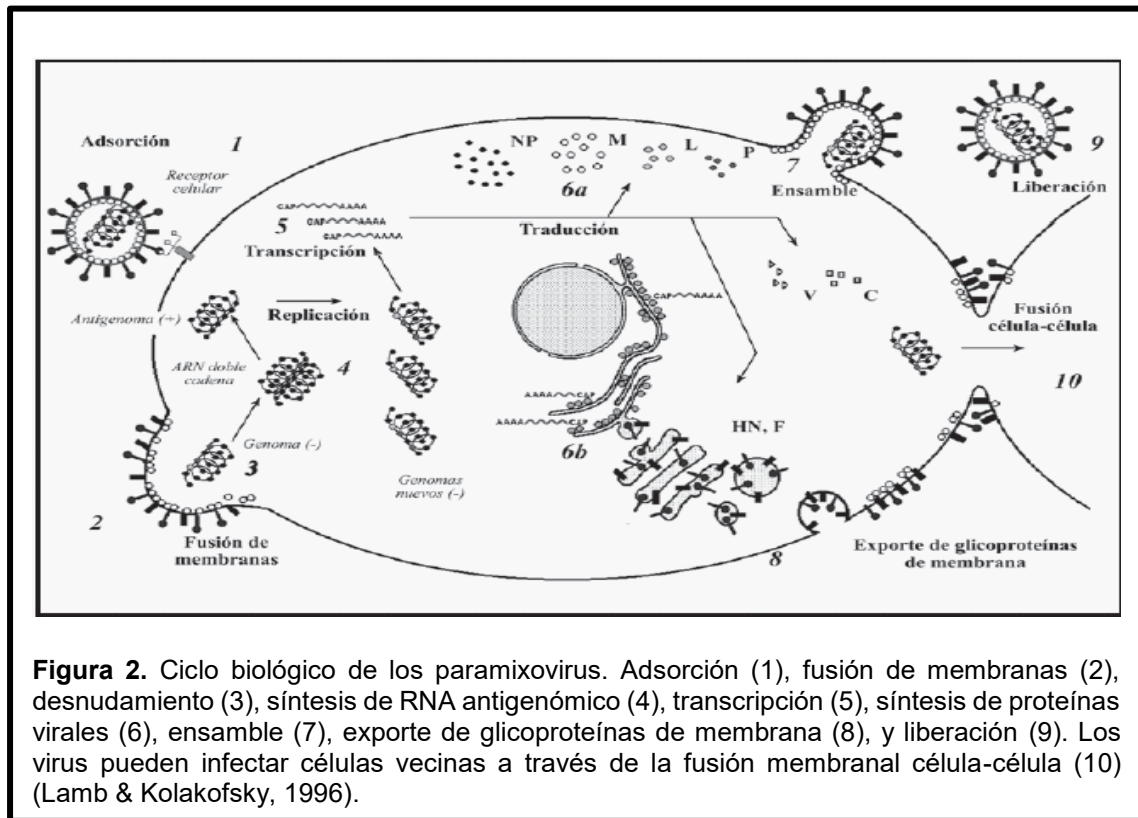
El genoma viral de los paramixovirus está constituido por alrededor de 15 000 nucleótidos, organizado en 6 genes (Figura 1) los cuales codifican entre 7-9 proteínas estructurales y no estructurales: NP (Nucleoproteína), M (proteína de Matriz), F (proteína de fusión), HN (Hemaglutinina-Neuraminidasa), P (Fosfoproteína), V (péptido V), C (péptido C) y la menos abundante proteína L (proteína de alto peso molecular) (Jack et al, 2005).



1.3.3 Ciclo biológico

El ciclo biológico de los paramixovirus se lleva a cabo en citoplasma (Figura 2) incluye diversas fases cuya finalidad es la replicación del virus. En la primera fase de adsorción la partícula viral se adsorbe a la membrana de la célula por medio de un receptor específico, proteína HN. Un cambio conformacional en HN activa a la proteína F que expone un dominio altamente hidrofóbico mediante el cual fusiona las membranas celular y viral. La integración de la membrana viral al sistema de membranas celulares provoca la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. Al liberarse el RNA viral se sintetiza una copia completa del genoma en sentido positivo de los mRNA que codifican cada una de las proteínas virales. Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble en donde las proteínas NP, P y L son acopladas al RNA recién sintetizado y la proteína M se acumula en la parte interna de la membrana celular. Las proteínas HN y F sintetizadas en el retículo endoplásmico son modificadas en el aparato de Golgi y posteriormente expresadas en la membrana, en sitios de contacto con la proteína M. La afinidad de la proteína

NP con la proteína M y otras glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, liberado de la célula por exocitosis (Lamb & Kolakofsky, 1996).



1.3.4 Polimerasa viral (gen L)

Los paramixovirus contienen RNA de polaridad negativa por lo que requieren de una polimerasa dependiente de RNA para la replicación y transcripción, procesos conservados entre los diferentes paramixovirus. El tamaño del gen L varía en algunos géneros. El gen L del Virus Parainfluenza 5 o Virus de Simios 5 contiene 6804 nucleótidos (Lamb & Paterson, 1991) que codifica para la proteína L de más de 2200 aminoácidos. Esta proteína contiene los centros catalíticos para la síntesis de RNA y mRNA.

Diversos análisis bioinformáticos han identificado 6 dominios altamente conservados conectados por regiones variables en la proteína L de los monegavirales (Figura 3). Aunque las funciones de cada dominio en referencia al

complejo ribonucleoproteico no son totalmente precisas, el dominio I se encuentra involucrado en procesos de oligomerización de la proteína L, el VI presenta actividad de metiltransferasa y el dominio III está implicado en la formación del enlace fosfodiéster durante la polimerización de RNA (Cox & Plemper, 2015) además de ser considerado el dominio de mayor conservación entre los monegavirales.

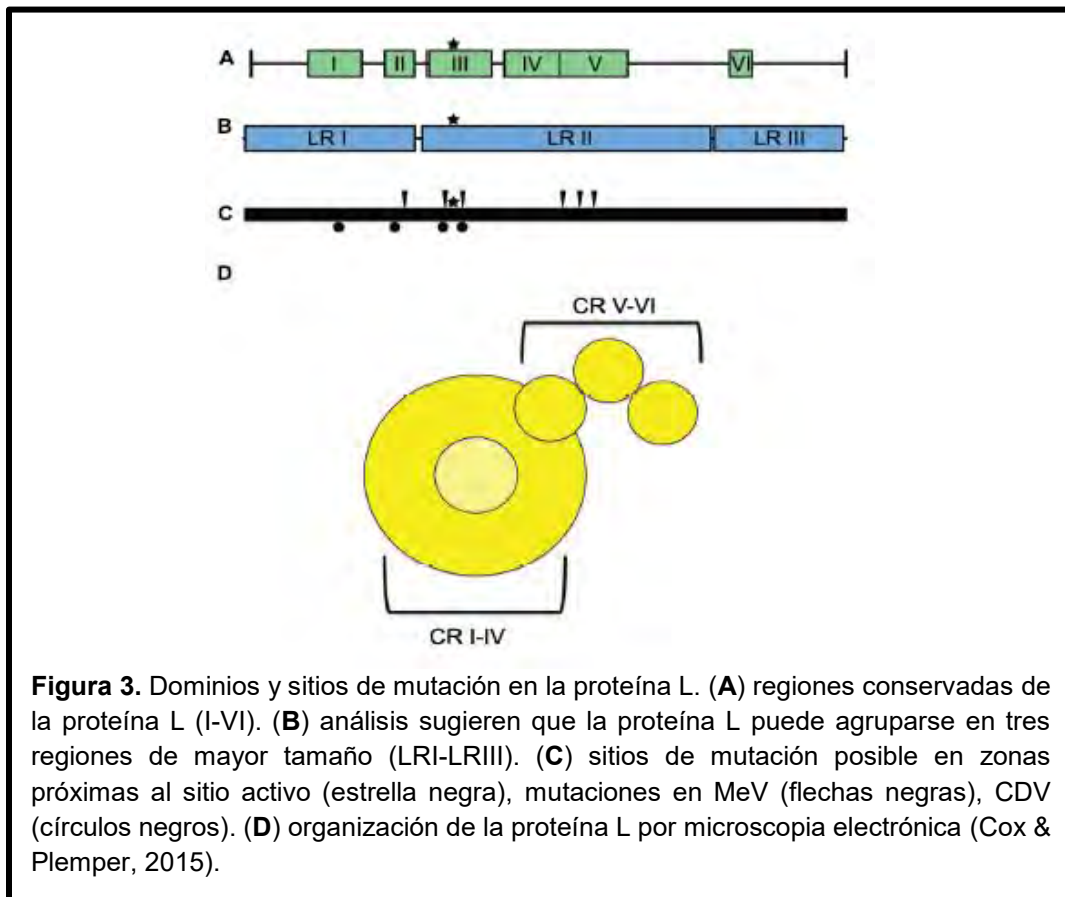


Figura 3. Dominios y sitios de mutación en la proteína L. (A) regiones conservadas de la proteína L (I-VI). (B) análisis sugieren que la proteína L puede agruparse en tres regiones de mayor tamaño (LRI-LRIII). (C) sitios de mutación posible en zonas próximas al sitio activo (estrella negra), mutaciones en MeV (flechas negras), CDV (círculos negros). (D) organización de la proteína L por microscopía electrónica (Cox & Plemper, 2015).

El dominio III contiene 4 motivos (A, B, C, D), el motivo C contiene un tripéptido (GDN) altamente conservado en el gen L dentro de los mononegavirales, este motivo es necesario para la formación del enlace fosfodiéster (Poch *et al*, 1990). En la mayoría de los mononegavirales el residuo siguiente al tripéptido es Q, excluyendo los virus HeV, NiV y Virus Tupaia (TPMV) en donde este residuo se encuentra remplazado por E.

En el virus de la rabia las mutaciones del motivo GDNQ han permitido observar el efecto de estas variaciones. El cambio de GDNQ a GDNN provoca la pérdida total de actividad como polimerasa, mientras que la mutación a GDNE genera una actividad de polimerasa muy baja (Schnell & K, 1995). La Mutación de GDN a GDD utilizando el virus de la estomatitis vesicular (VSV) redujo la actividad de polimerasa en un 73%, mientras que la mutación a GDNN disminuyó la actividad de polimerasa en un 95% (Sleat & Banerjee, 1993).

1.3.5 Paramixovirus en murciélagos

Como se mencionó en capítulos anteriores algunos virus de la subfamilia *Paramyxovirinae* han sido detectados en murciélagos, de los cuales se citan algunos ejemplos: virus Mapuera (MPRV) aislado de las glándulas salivales de un murciélago frugívoro aparentemente sano (*Sturnira lilium*) en Brasil 1979; estudios recientes comparan la secuencia del virus Mapuera con el PorPV originalmente llamado Virus de la Piedad Michoacán México (LPMV) que afecta a cerdos en México desde 1980; encontrándose una estrecha relación entre ambos (Wang *et al*, 2007). El virus Hendra causó la muerte de 14 caballos y una persona en Australia 1994 (Halpin *et al*, 2000), estudios serológicos en 1999 indicaron que un murciélago frugívoro probablemente es el hospedero natural de este virus (Young *et al*, 1996). En 1999 el virus Hendra se relacionado con el virus Nipah, el cual surgió en Malasia causando la muerte de aproximadamente 100 personas además de 1 millón de cerdos (Chua *et al*, 2000). En algunos brotes entre 2001 y 2005, se ha detectado la presencia del virus en India y Bangladesh, además estudios serológicos sugieren que un virus similar está presente en la población de murciélagos frugívoros en Camboya (Reynes *et al*, 2005), Tailandia (Sendow *et al*, 2006) e Indonesia (Wacharapluesadee *et al*, 2005). El virus Menangle fue aislado en cerdos recién nacidos en Australia 1997, la evidencia serológica indica que posiblemente causa enfermedad similar a influenza en humanos que han estado en contacto con los animales infectados (Chant *et al*, 1998). La presencia de anticuerpos en algunos murciélagos frugívoros sugiere que pueden ser el hospedero natural de este virus

(Philbey *et al*, 1998). En el año 2000 el virus Tioman fue aislado de la orina de un murciélago frugívoro en la isla de Tioman Malasia (Chua *et al*, 2001). La caracterización molecular reveló que el virus Menangle y el virus Tioman están altamente relacionados con el género *Rubulavirus* (Chua *et al*, 2002).

1.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO VIRAL

Mediante el uso de diferentes procedimientos como aislamiento viral, análisis serológico y molecular, los paramixovirus han sido identificados en una gran variedad de hospederos incluidos aves, animales acuáticos, roedores, perros, gatos, borregos, reptiles, caballos, animales de ganadería, simios, cerdos, murciélagos y humanos. Por ello se considera que los virus de la familia *Paramyxoviridae* constituyen un importante blanco para la implementación de métodos de detección viral (Tong *et al*, 2008).

1.4.1 Aislamiento viral

La base del diagnóstico viral es la detección del virus o de sus componentes. El aislamiento viral es la técnica estándar de oro, se realiza en cultivos de tejidos donde posteriormente se obtienen los virus necesarios para la realización de pruebas complementarias. Para aislar el virus es necesario inocular la muestra clínica en cultivos celulares sensibles al virus que presuntamente se encuentra en la muestra. Los cultivos inoculados se evalúan diariamente para determinar la presencia de efecto citopático comparado con los cultivos no inoculados. Cuando el 50% de la monocapa muestra efecto se puede analizar mediante otras técnicas (Shors, 2009).

1.4.2 Hemaglutinación (HA)

La hemaglutinación es una técnica simple y rápida basada en la capacidad del virus para aglutinar eritrocitos, los cuales presentan receptores para las proteínas de unión de los viriones (hemaglutinina). Esta prueba permite determinar la cantidad de virus presentes en una muestra. Se lleva a cabo mediante diluciones seriadas del virus mezcladas con una cantidad determinada de eritrocitos depositados en pozos de placas de fondo en “U”. Si las células no se unen al virus los eritrocitos sedimentan en el fondo de la placa formando un botón lo cual significa un resultado negativo. Por otro parte si los eritrocitos se unen al virus se forma un aglutinado o hemaglutinación que cubre el pozo (Córdova *et al*, 2010).

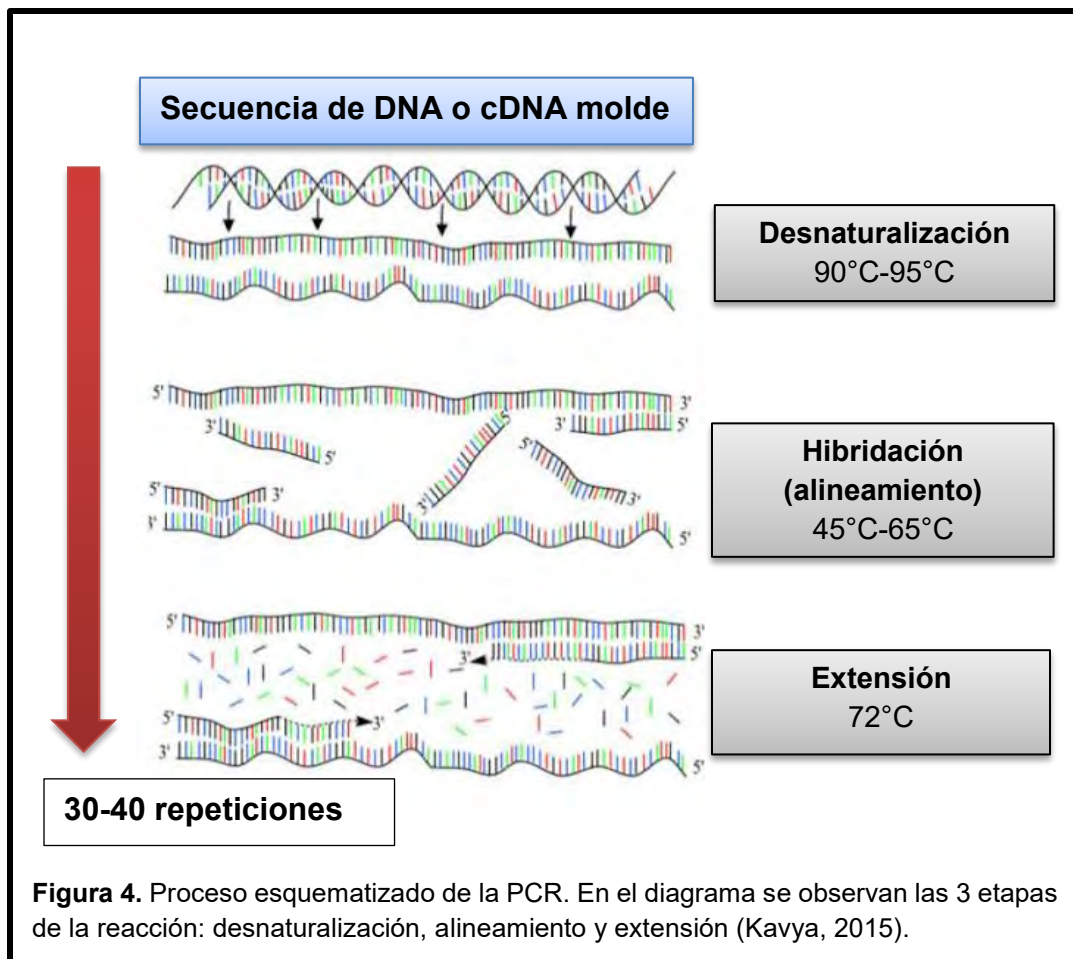
1.4.3 Ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)

El ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa es un método sensible y específico que se utiliza para la detección de anticuerpos específicos producidos contra un virus específico. La técnica consiste en infectar monoestratos de células con el virus de referencia, las que después de un periodo de incubación se fijan en paraformaldehído para su posterior uso. Las células al estar en contacto con los sueros controles o problema produce la unión antígeno-anticuerpo que puede ser detectada a través del uso de anticuerpos secundarios marcados con una enzima que en presencia del sustrato convierte al cromógeno (incoloro) en un compuesto coloreado e insoluble, el cual puede ser visualizado al microscopio óptico.

1.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis en 1985, es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de DNA. Existen diversas variantes de la PCR, en este trabajo se realizaron RT-PCR y PCR semi-anidada. La técnica de PCR requiere de una mezcla de reacción que contenga: una solución amortiguadora, un cofactor enzimático ($MgCl_2$), una DNA

polimerasa DNA-dependiente termoestable (*Taq polimerasa*), una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato de adenina, guanina, citosina, y timina, además de dos moléculas de oligonucleótidos de cadena sencilla (16 a 24 nucleótidos) los cuales delimitan el fragmento que se desea amplificar, ya que contiene la secuencia complementaria a los extremos de la secuencia génica de interés. La técnica se lleva a cabo mediante en una serie de cambios de temperatura programados en un termociclador, las 3 etapas de temperaturas de la PCR (Figura 4) se denominan: desnaturalización, alineación y extensión.



En la etapa de desnaturalización (90°C-95°C) permite que el DNA de doble cadena se separe en dos cadenas sencillas. La temperatura de alineación (45°C-65°C) permite la unión de los iniciadores a sus cadenas complementarias. La temperatura de alineamiento es variable y está determinada por la secuencia de los iniciadores. Finalmente la temperatura de extensión (72°C) permite la síntesis de las nuevas cadenas mediante la DNA polimerasa (Alcántara *et al*, 2012).

- a) **Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR):** es una técnica empleada para identificar RNA, para ello es necesario sintetizar un DNA complementario (cDNA) a la cadena de RNA mediante la enzima transcriptasa inversa. Este DNA complementario se puede amplificar mediante la técnica convencional de PCR utilizando iniciadores relativos a la secuencia del RNA que se analiza (González, 2010).

- b) **PCR anidada:** es una variante muy sensible y específica de PCR; esta técnica amplifica DNA en dos rondas de amplificación mediante el uso de iniciadores distintos en cada ronda. La primer PCR se realiza con un juego de iniciadores externos amplificando una región de DNA extensa la cual contiene el segmento blanco de la segunda PCR mediante el uso de cebadores internos amplificando una región más pequeña, por lo tanto el segundo producto de PCR es más pequeño que el inicial (Salazar *et al*, 2013). La PCR semi-anidada realizada en este trabajo (Figura 5) es aquella que utiliza dos iniciadores externos en la primer etapa y un iniciador interno junto con un iniciador externo en la segunda etapa.

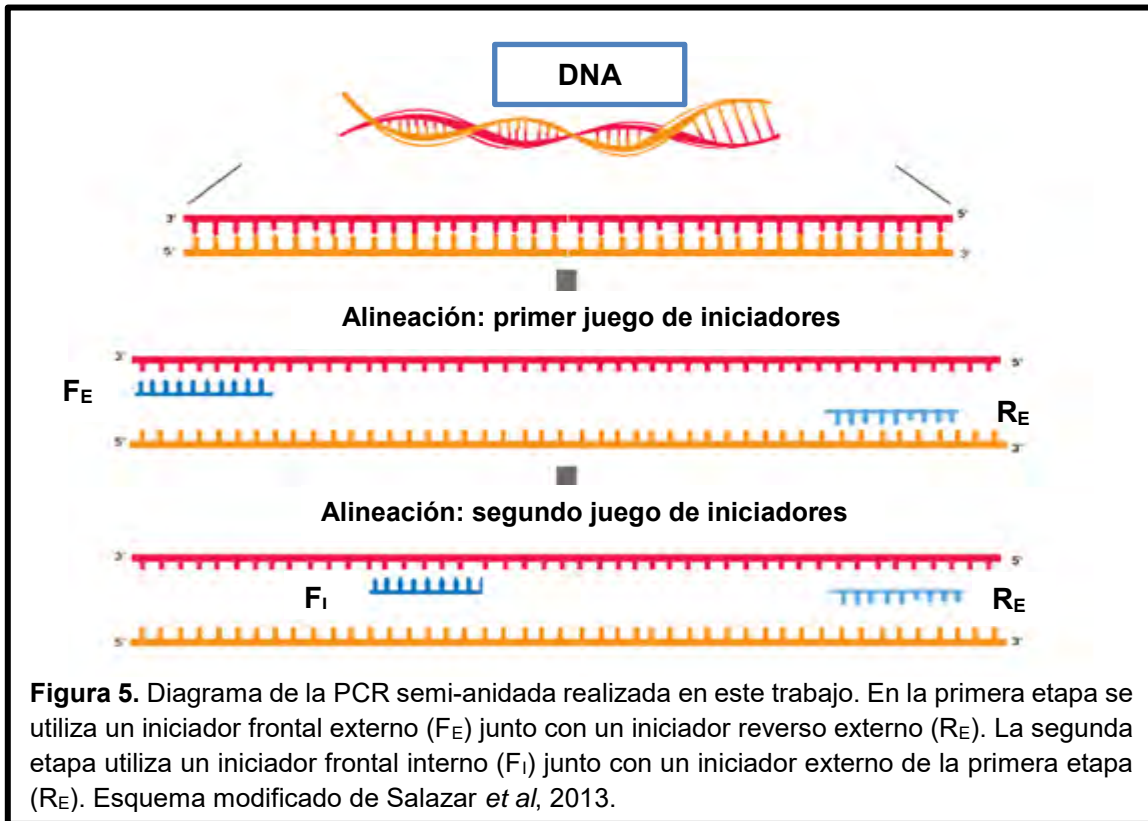


Figura 5. Diagrama de la PCR semi-anidada realizada en este trabajo. En la primera etapa se utiliza un iniciador frontal externo (F_E) junto con un iniciador reverso externo (R_E). La segunda etapa utiliza un iniciador frontal interno (F_I) junto con un iniciador externo de la primera etapa (R_E). Esquema modificado de Salazar *et al*, 2013.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años se ha estudiado el papel de los murciélagos como transmisores de enfermedades infecciosas debido a que algunas de sus características los han hecho anfitriones adecuados a virus y otros patógenos (Calisher *et al*, 2006). Algunos de estos estudios han mostrado la presencia en murciélagos de virus RNA en su mayoría, muchos de estos virus causando grave morbilidad y mortalidad en humanos y algunos mamíferos sin causar enfermedad aparente en murciélagos (Papenfuss *et al*, 2012). Aproximadamente el 75% de las enfermedades infecciosas emergentes se deben a zoonosis (Traversa, 2005). Actualmente más de 60 virus nuevos filogenéticamente relacionados con virus de la familia *Paramyxoviridae* han sido identificados en murciélagos (Santos *et al*, 2011).

La gran abundancia de los murciélagos y su evidente participación en la presentación de nuevas enfermedades emergentes en humanos y animales los hace muy importantes para este trabajo como posibles vectores o reservorios de diferentes agentes infecciosos virales. Dado que en México pocos estudios se han realizado para poder identificar la circulación de estos virus en las poblaciones de murciélagos, en particular se pretende adecuar las condiciones de un método de PCR semi-anidada que permita la identificación de virus de la familia *Paramyxoviridae* en murciélagos, para así conocer la relación filogenética con otros virus del mismo género en referencia a una secuencia conservada de la polimerasa viral.

3. HIPÓTESIS

Si los murciélagos se encuentran infectados por algún virus de la familia *Paramyxoviridae*, se podrá identificar la presencia de una secuencia altamente conservada de la polimerasa viral en muestras de tejido cerebral mediante la técnica de PCR semi-anidada.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Identificar y caracterizar un segmento conservado de la polimerasa viral mediante la técnica de PCR utilizando muestras de cerebro de murciélagos para determinar si existe circulación de virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae* en murciélagos.

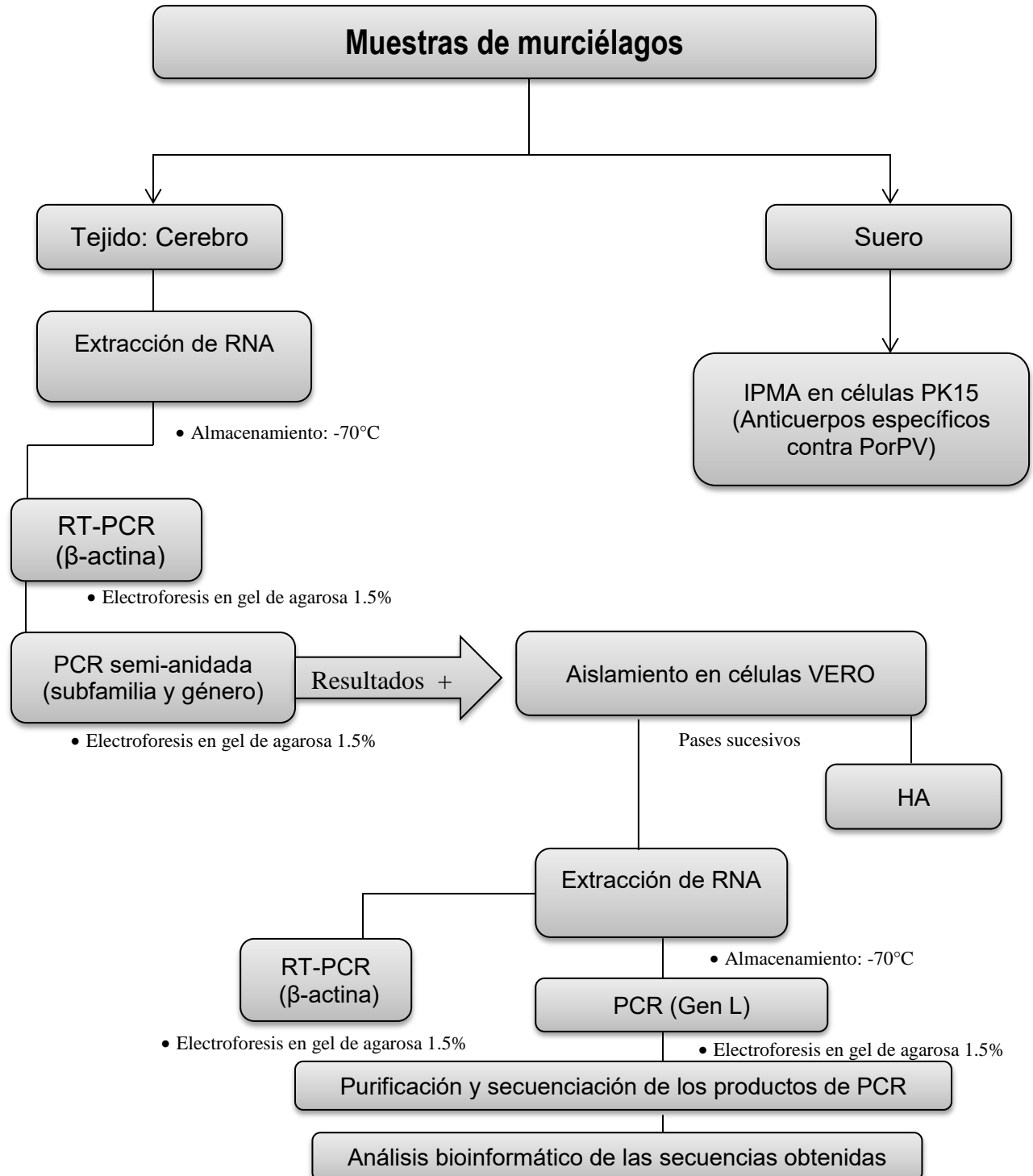
OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Adecuar las condiciones óptimas de la prueba de PCR semi-anidada para la identificación del gen L de virus de la familia *Paramyxoviridae* en murciélagos.
- ❖ Purificar los productos de PCR para determinar la secuencia que codifica para la polimerasa viral (gen L) utilizando los mismos iniciadores.
- ❖ Realizar un análisis bioinformático a las secuencias obtenidas mediante el uso del software SeqMan (Lasergene DNASTAR 7.0) y Mega 5.0 para su identificación y comparación con lo reportado en el GenBank.
- ❖ Evaluar los sueros de murciélago mediante la técnica de inmunoperoxidasa para determinar la presencia de anticuerpos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama general.

La metodología general se describe a continuación en un diagrama, posteriormente es desglosada.



5.2 Muestras

Se emplearon 34 muestras de cerebro de murciélagos de 8 diferentes especies (Cuadro 2) pertenecientes a la Colección de Mamíferos del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (SEMARNAT DGVS permiso FAUT-0211) capturados en el estado de Morelos 2013, temporalmente localizados en el CENID-Microbiología, INIFAP, México.

De cada espécimen seleccionado se obtuvo una porción de tejido de cerebro (50-100 mg) y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Cuadro 2. Clasificación de las muestras analizadas de acuerdo al número de identificación, familia, género, especie y tipo de alimentación.

Identificación de muestra (#)	Familia	Género	Especie	Tipo de alimentación
1	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	Insectívoro
2	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida</i>	<i>brasiliensis</i>	Insectívoro
3	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Hematófago
4	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Hematófago
5	<i>Mormoopidae</i>	<i>Pteronotus</i>	<i>parmallii</i>	Insectívoro
6	<i>Mormoopidae</i>	<i>Pteronotus</i>	<i>parmallii</i>	Insectívoro
8	<i>Mormoopidae</i>	<i>Pteronotus</i>	<i>parmallii</i>	Insectívoro
9	<i>Mormoopidae</i>	<i>Pteronotus</i>	<i>parmallii</i>	Insectívoro
12	<i>Mormoopidae</i>	<i>Pteronotus</i>	<i>parmallii</i>	Insectívoro
13	<i>Mormoopidae</i>	<i>Pteronotus</i>	<i>parmallii</i>	Insectívoro
14	<i>Emballonuridae</i>	<i>Balantiopteryx</i>	<i>plicata</i>	Insectívoro
15	<i>Emballonuridae</i>	<i>Balantiopteryx</i>	<i>plicata</i>	Insectívoro
16	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Macrotus</i>	<i>waterhousii</i>	Insectívoro
17	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
18	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
19	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
20	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
21	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
22	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
23	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
24	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
26	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
27	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
28	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
29	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
32	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
33	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
34	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
35	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus</i>	<i>hirsutus</i>	Frugívoro
36	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	Néctar
37	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	Néctar
38	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	Néctar
41	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Frugívoro
42	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Hematófago

5.3 Extracción y cuantificación de RNA

Para la extracción de RNA de cerebro se utilizó TRizol® Reagent (#64935101) listo para usarse. Es una solución monofásica compuesta de fenol e isotiocianato de guanidina diseñada para el aislamiento de RNA a partir de muestras de tejidos y células. Las muestras de RNA fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro considerando la diferencia entre la Densidad Óptica (DO) 260/280 nm, donde se estableció un criterio de selección para incluir en este estudio solamente las muestras que presentaran un valor superior a 1.8 indicativo de la calidad y pureza del RNA.

A todas las muestras de cerebro (30 mg) se les adicionó 1 mL de TRizol® Reagent (#64935101) y se homogenizó durante 1 minuto, se agregaron 200µL de cloroformo frío (4°C) y se mezcló perfectamente dejando reposar por 3 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C para obtener 3 fases (fase acuosa, interfase y fase orgánica). El RNA se encuentra en la fase acuosa, la cual se extrajo y colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL junto con 500µL de isopropanol frío (4°C); para la precipitación del RNA se mezcló perfectamente y se almacenó a -20°C durante 24 horas. Al día siguiente se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C, después se retiró el isopropanol sin remover el botón y se agregó 1 mL de etanol al 75% mezclándose perfectamente seguido de una centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el etanol sin remover el botón y se dejó secar a temperatura ambiente bajo la luz de la campana de flujo laminar. Finalmente se adicionaron 30µL de agua DEPC libre de RNAsas y se almacenó a -70°C hasta su uso.

❖ La cuantificación de RNA se llevó a cabo con 2µL de muestra mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c de Thermo Scientific®, el cual permite medir volúmenes desde 0.5µL.

5.4 Síntesis de DNA (cadena complementaria cDNA)

Para realizar la síntesis de cDNA se preparó una solución por reacción compuesta de: 2µL de “Random primers” (Promega #C1181), 3.0µL de agua DEPC y 5µL de RNA, después se realizó una desnaturalización a 65°C por 5 minutos. Finalizado el ciclo las muestras se mantuvieron en hielo hasta la adición de la segunda mezcla. La segunda mezcla de reacción estaba compuesta de: 4µL de “Buffer 5X”, 2µL de DTT [0.1mM], 2µL de dNTPs [10 mM], 1µL de inhibidor de ribonucleasas (Promega) y 1µL de la enzima M-MLV-RT (Promega) a un volumen final de 20µL. Finalmente las muestras se colocaron en un Termociclador Mastercycler gradient 5331 Eppendorf Versión 2.30.31-09, el cual se programó de acuerdo al siguiente protocolo: 20°C por 5 minutos, 37°C por 90 minutos y 95°C por 5 minutos.

Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.5 Identificación del gen de control interno β-actina mediante RT-PCR

Para verificar la integridad del RNA se realizó la RT-PCR para el gen β-actina. La preparación de la mezcla (Cuadro 3) se realizó a volumen de 25µL.

Los iniciadores utilizados (Cuadro 4) amplifican un fragmento del gen β-actina; región altamente homóloga en roedores, aves, y vertebrados (murciélagos) de aproximadamente 300 pb.

Cuadro 3. Mezcla de reacción para la amplificación de β -actina

Reactivo	Cantidad (μ L)
Buffer 5X	2.5
dNTPs [10 mM],	0.5
Iniciador F [10 mM],	1
Iniciador R [10 mM],	1
MgCl ₂ [25mM]	2.5
AmpliAq Gold® (ThermoFisher Scientific)	0.5
Agua libre de RNAsas	14
cDNA	3
Volumen total	25μL

Cuadro 4. Iniciadores usados en la amplificación de β -actina (Raff *et al*, 1997)

Gen blanco	Secuencia (5'→3')	Producto de amplificación
β -actina	F GGA ^{CTTCGAGCAGGAGTGG} R GCACCGTGTGGCGTAGAGG	300 pb
F: Forward primer (Iniciador frontal) R:Reverse primer (Iniciador reverso) pb: pares de bases		

El protocolo de amplificación se llevó acabo en un Termociclador Mastercycler gradient 5331 Eppendorf Versión 2.30.31-09 a las siguientes condiciones: 95°C por 2 minutos; seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; y finalmente 72°C por 5 minutos.

❖ Los productos obtenidos de la RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% (120 V, 40 minutos), utilizando bromuro de etidio como revelador en un Transiluminador UV.

5.6 PCR semi-anidada (identificación de subfamilia y género)

Para la detección e identificación de virus pertenecientes a la subfamilia *Paramyxovirinae* géneros *Avulavirus*, *Rubulavirus*, *Respirovirus*, *Morbilivirus* y *Henipavirus* en muestras clínicas, se utilizaron iniciadores altamente específicos (Tong *et al*, 2008) para amplificar un fragmento de la polimerasa viral mediante RT-PCR semi-anidada. La PCR se realizó en dos etapas.

La primera etapa de reacción contiene iniciadores externos (F₁, R) que permiten amplificar una región de DNA más extensa (<600 pb). La preparación de la mezcla (Cuadro 5) se realizó a volumen de 25µL.

El producto obtenido de la primer PCR se utilizó como muestra de la segunda reacción, adicionando iniciadores internos (F₂, R) para amplificación de una región de menor tamaño (500 pb). La preparación de la mezcla (Cuadro 6) se realizó a volumen de 25µL. Los iniciadores utilizados se muestran en el cuadro 7 (Tong *et al*, 2008).

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la primer etapa de la PCR semi-anidada (identificación de la subfamilia *Paramyxovirinae*)

Reactivo	Cantidad (µL)
Buffer 5X	2.5
dNTPs [10 mM],	0.5
Iniciador PAR F ₁ [10 mM]	0.5
Iniciador PAR R [10 mM]	0.5
MgCl ₂ [25mM]	2.5
AmpliTaq Gold® (ThermoFisher Scientific)	0.5
Agua libre de RNAsas	15
cDNA	3
Volumen total	25µL

Cuadro 6. Mezcla de reacción para la segunda etapa de la PCR semi-anidada (identificación de la subfamilia *Paramyxovirinae*)

Reactivo	Cantidad (µL)
Buffer 5X	2.5
dNTPs [10 mM],	0.5
Iniciador PAR F ₂ [10 mM]	0.5
Iniciador PAR R [10 mM]	0.5
MgCl ₂ [25mM]	2.5
AmpliTaq Gold® (ThermoFisher Scientific)	0.5
Agua libre de RNAsas	15
Producto de PCR ₁	3
Volumen total	25µL

El protocolo de amplificación para ambas reacciones se llevó a cabo en un Termociclador Mastercycler gradient 5331 Eppendorf Versión 2.30.31-09 a las siguientes condiciones: 95°C por 2 minutos; seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 49°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; y finalmente 72°C por 5 minutos.

NOTA: La identificación de los géneros *Avulavirus*, *Rubulavirus*, *Respirovirus*, *Morbilivirus* y *Henipavirus* fue realizada siguiendo el mismo protocolo de la PCR semi-anidada utilizada para la identificación de la subfamilia *Paramyxovirinae* (Sección 5.6) modificando los iniciadores específicos para cada género (Cuadro 7).

Cuadro 7. Iniciadores consenso y degenerados utilizados para la identificación de paramixovirus (Tong et al, 2008)

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Grupo blanco	Producto de amplificación
PAR-R	GCTGAAGTTACIGGITCICCDATRTTNC		
PAR-F ₁	GAAGGITATTGTCAIAARNTNTGGAC	Subfamilia <i>Paramyxovirinae</i>	<600pb
PAR-F ₂	GTTGCTTCA ATGGTTCARGGNGAYAA		
AVU-RUB R	GCAATTGCTTGATTITCICCYTGNAC	Género	
AVU-RUB F ₁	GGTTATCCTCATTITTYGARTGGATIICA	<i>Avulavirus</i>	<300pb
AVU-RUB F ₂	ACACTCTATGTIGGIGAICCNTTYAAYCC	<i>Rubulavirus</i>	
R-M-H-R	GTCCCACAAITTTTGRACCCANCCYTC	Género	
R-M-H-F ₁	GTGTAGGTAGIATGTTYGCNATGCARCC	<i>Respirovirus</i>	<600pb
R-M-H-F ₂	ACTGATCTIAGYAARTTYAAYCARGC	<i>Morbilivirus</i> <i>Henipavirus</i>	

❖ Los productos obtenidos de la PCR semi-anidada se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% (120 V, 40 minutos), utilizando bromuro de etidio como revelador en un Transiluminador UV.

5.7 Aislamiento viral

De las muestras detectadas como positivas por PCR en la identificación de subfamilia y género, fueron seleccionadas tres muestras de murciélagos para el aislamiento viral. Se trabajaron muestras de tres tejidos: cerebro, pulmón y riñón.

5.7.1 Cultivo en línea celular VERO (Células renales de mono verde africano)

Aproximadamente el 10% (p/v) de los tejidos (cerebro, pulmón y riñón) fueron homogenizados en 5 mL de DMEM con antibiótico (100 UI/mL de penicilina y 100 UI/mL de estreptomycin) separados mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, después se agregaron 100µL de inóculo en placas de 24 pozos con células VERO. Los cultivos celulares se observaron durante 96 horas para visualizar presencia o ausencia de efecto citopático. Como no se observó efecto citopático se realizaron 3 pases celulares (pases ciegos). Después de cada pase los cultivos fueron sometidos a un proceso de congelación y descongelación a -70°C (3 veces), posteriormente fueron colectados los sobrenadantes para la prueba de HA y PCR como se describió anteriormente en las secciones 5.3, 5.4, 5.5.y 5.6.

5.7.2 Amplificación de un fragmento del gen L de los aislamientos

Con las muestras obtenidas por aislamiento se realizó la identificación de un fragmento conservado de la polimerasa viral mediante la prueba de PCR utilizando un set de 3 juegos de iniciadores referenciados como PAR 12, PAR 13, y PAR 14 (Cuevas *et al*, 2016) los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 1000 pb respectivamente (Cuadro 9). Los productos obtenidos fueron purificados y enviados a secuenciar para su análisis bioinformático.

La preparación de la mezcla (Cuadro 8) se realizó a volumen de 25 µL.

Cuadro 8. Mezcla de reacción para la amplificación de un fragmento del gen L mediante PCR

Reactivo	Cantidad (µL)
Buffer 5X	2.5
dNTPs [10 mM],	0.5
Iniciador PAR12 F [10 mM]	1
Iniciador PAR 12 R [10 mM]	1
MgCl ₂ [25mM]	2.5
AmpliTaq Gold® (ThermoFisher Scientific)	0.5
Agua libre de RNAsas	15
cDNA	2
Volumen total	25µL

Cuadro 9. Iniciadores usados para la amplificación de un fragmento del gen L mediante PCR (Cuevas *et al*, 2016)

Iniciadores (ubicación de acuerdo al genoma)	Secuencia (5'→3')	Producto de amplificación
PAR 12 (9339-9359) (10380-10363)	F CTTGTCTATTGGATAGCAACC R TAGCGCCACTGTAAGCAG	1000 pb
PAR 13 (10281-10300) (11322-11305)	F AGACTGCGAATCGAGACACC R CTCCCTGGCTTTCGCATC	1000 pb
PAR 14 (11191-11210) (12211-12193)	F CTGCAGTCGCCTATTCAACC R GAGCGGAGTGAGTGCTCTG	1000 pb

El protocolo de amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Mastercycler gradient 5331 Eppendorf Versión 2.30.31-09 con las siguientes condiciones: 95°C por 2 minutos; seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; y finalmente 72°C por 5 minutos.

❖ Los productos obtenidos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% (120 V, 40 minutos), utilizando bromuro de etidio como revelador en un Transiluminador UV.

5.7.3 Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el kit Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System (Promega #A9281/2/5) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se midió el volumen total del producto de PCR (20µL) y posteriormente se agregó el mismo volumen de buffer de unión mezclando suavemente. La mezcla se colocó en la columna de purificación (1 minuto de incubación a temperatura ambiente) y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Después se agregaron 700µL de buffer de lavado y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. El paso anterior se repitió con 500µL de buffer de lavado centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos. Se realizó una segunda centrifugación a 12000 rpm por 1 minuto con la finalidad de eliminar residuos presentes. Posteriormente la columna se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL adicionando 30µL de agua libre de nucleasas (1 minuto de incubación a temperatura ambiente) y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se eliminó la columna y el producto de purificación se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.7.4 Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR purificados se enviaron a secuenciar mediante la metodología de Sanger al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

5.7.5 Análisis bioinformático de la secuencias

El análisis bioinformático de las secuencias se realizó utilizando el programa SeqMan (Lasergene DNASTAR 7.0) y Mega 5.0. Las secuencias consenso fueron comparadas con lo reportado en el GenBank, los alineamientos y el árbol filogenético se obtuvo mediante el programa Mega 5.0.

5.8 Detección de anticuerpos mediante la prueba de IPMA (Ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa)

Los sueros de murciélagos fueron analizados mediante la prueba de IPMA en placas de 96 pozos, usando métodos descritos previamente (Rivera-Benítez *et al*, 2010). Como virus de referencia se utilizó el Rubulavirus porcino (PorPV).

Se utilizaron células PK15 infectadas por PorPV (cepa de referencia PorPV-PAC3/1992) previamente incubadas 48 horas a 37°C con 5% CO₂. Las placas fueron fijadas con paraformaldehído 4% (20 minutos). Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionó una solución de peróxido de hidrógeno 3% en metanol durante 20 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de bloquear la peroxidasa endógena. Se lavaron las placas con PBS (3 repeticiones) y se agregaron los sueros problema realizando diluciones seriadas dejando actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se realizó un segundo lavado con PBS y se adicionó Proteína A marcada con peroxidasa (A-HRP) (Sigma) dilución 1:200 incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se agregó 35µL del substrato AEC (3-amino, 9 etil carbasol) (Invitrogen) dejando actuar durante 15 minutos. Finalmente las placas se lavaron con PBS y se observaron en microscopio invertido.

La presencia de agregados color marrón en el citoplasma denota un resultado positivo, indicativo de una reacción antígeno-anticuerpo.

6. RESULTADOS

De las 34 muestras de cerebro procesadas para la obtención de RNA, 27 fueron seleccionadas para ser trabajadas en las pruebas de PCR debido a que presentaron una calidad aceptable con un valor de entre 1.8 y 2.0 (DO260nm/DO280nm). Las 7 muestras restantes no presentaron la calidad de RNA requerida y fueron descartadas por falta de material biológico (muestras # 4, 12, 13, 14, 17, 24, y 26).

6.1 Identificación del gen de control interno beta-actina (β -actina)

De las 27 muestras de RNA trabajadas para la identificación del gen de control interno β -actina, las 27 fueron detectadas positivas para la amplificación de este gen (Figura 6). El producto amplificado fue de 300 pb corresponde al tamaño esperado para β -actina.

Muestras positivas para el gen interno β -actina

1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 27, 28,
29, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42

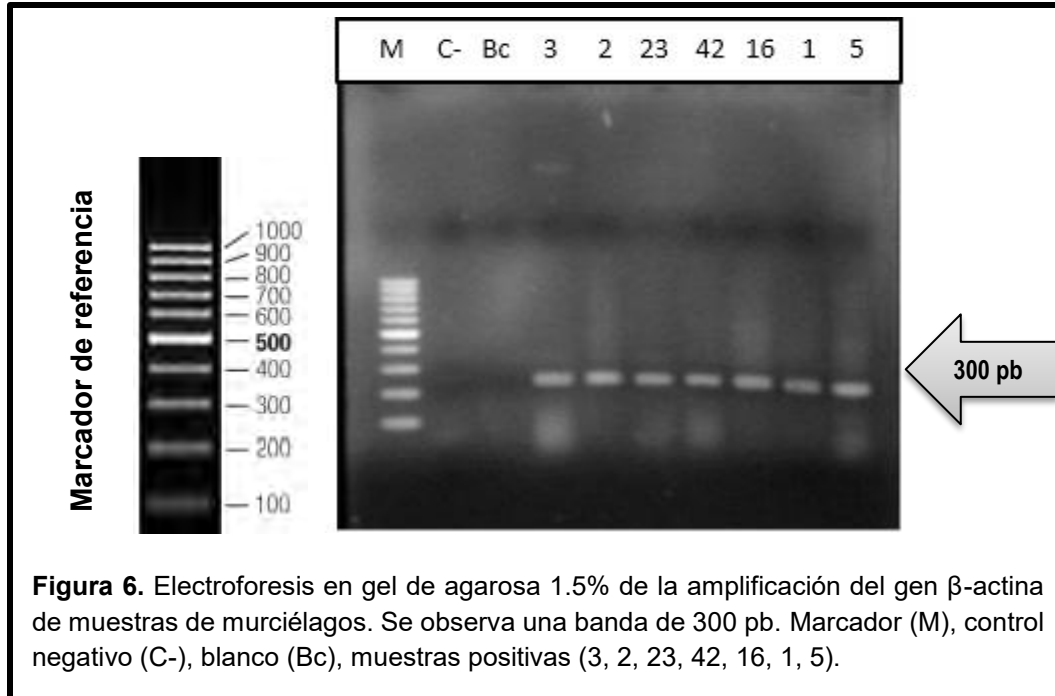


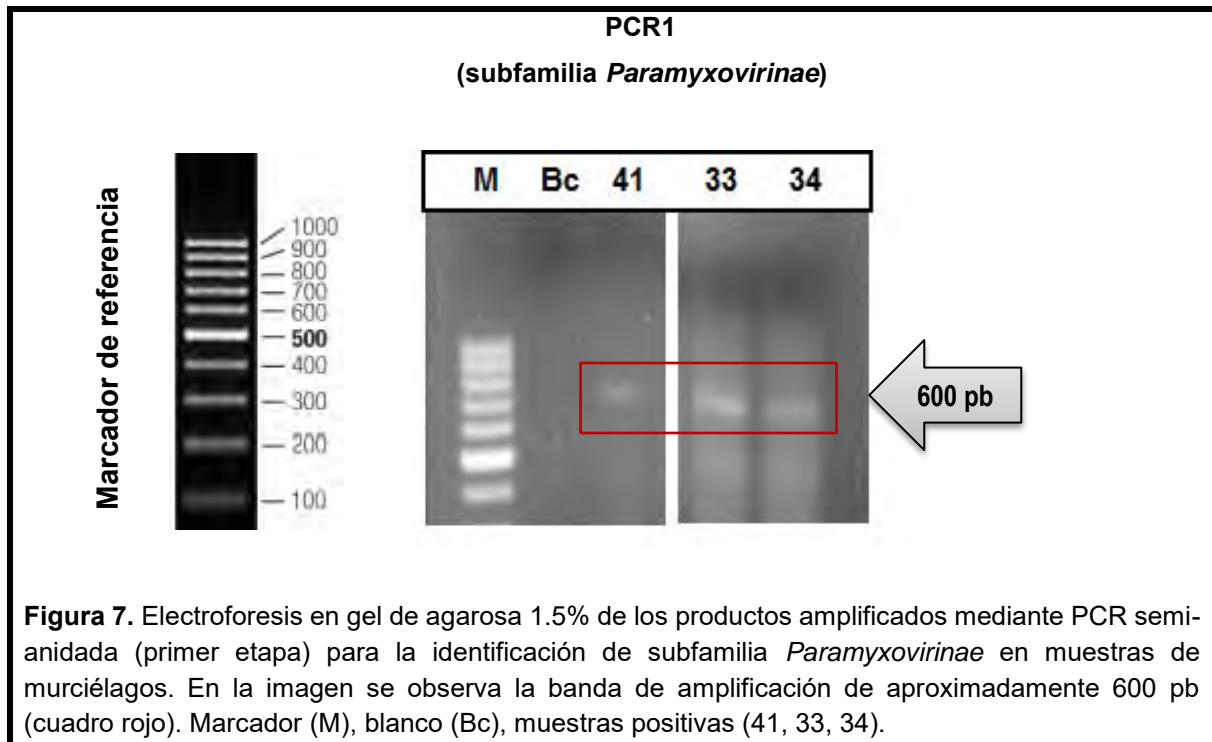
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de la amplificación del gen β -actina de muestras de murciélagos. Se observa una banda de 300 pb. Marcador (M), control negativo (C-), blanco (Bc), muestras positivas (3, 2, 23, 42, 16, 1, 5).

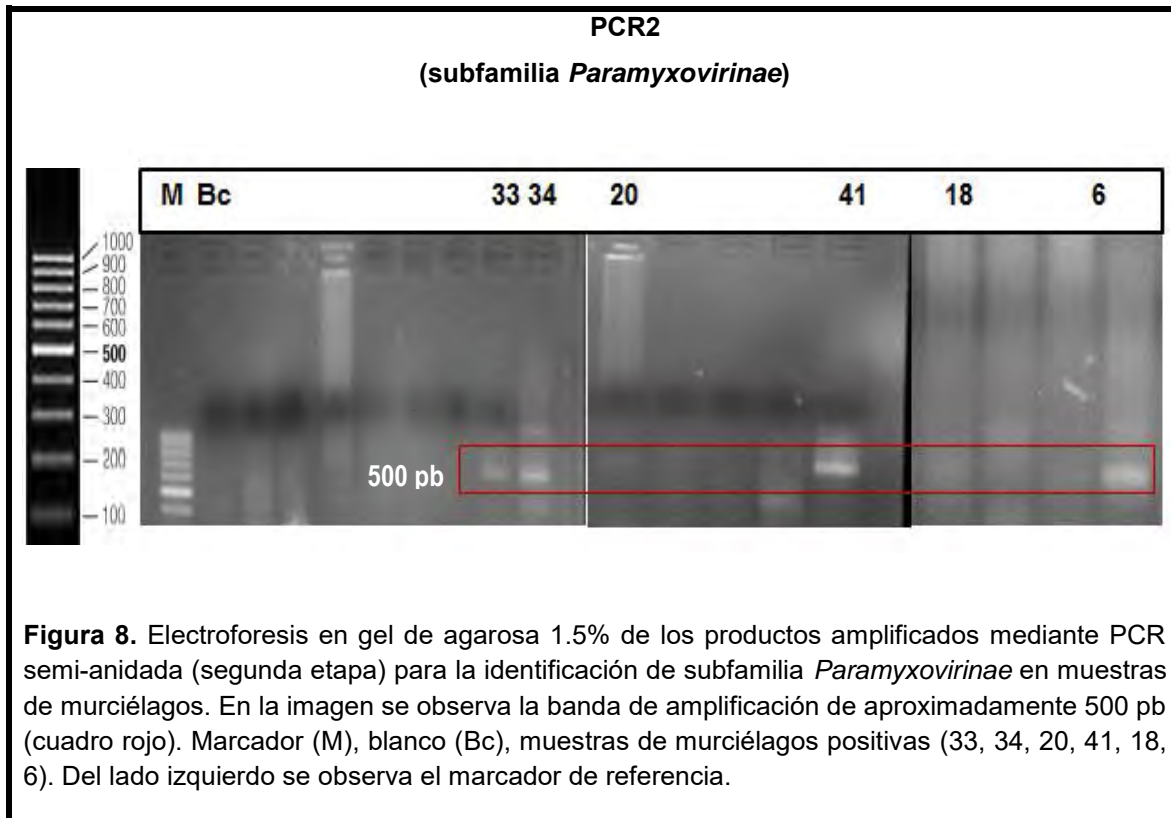
6.2 PCR semi-anidada (identificación de subfamilia y género)

A las 27 muestras positivas para β -actina se les realizó la PCR semi-anidada con iniciadores específicos diseñados para amplificar un fragmento de la polimerasa viral donde se localizan motivos altamente conservados en los paramixovirus (Tong *et al*, 2008). De las 27 muestras trabajadas: 11 (41%) fueron positivas en por lo menos una prueba de PCR, 6 (22%) fueron positivas para subfamilia *Paramyxovirinae*, 11 (41%) positivas a los géneros *Aulavirus-Rubulvirus* (Cuadro 10, Figura 7, 8, 9 y 10), 6 de estas muestras fueron sometidas a otra PCR para género *Respirovirus-Morbilivirus-Henipavirus* resultando negativas (Cuadro 10).

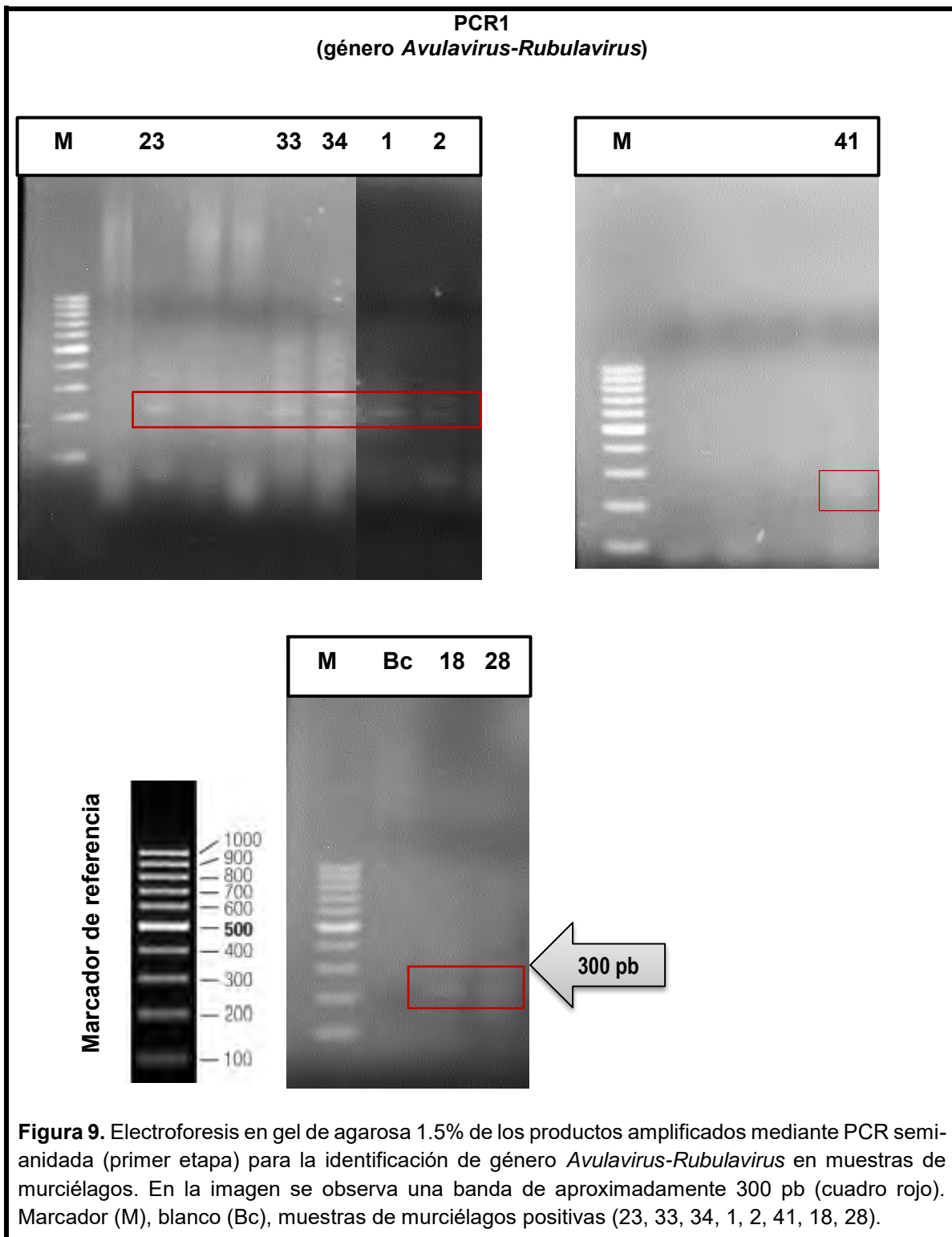
Cuadro 10. Resultados de la PCR semi-anidada para la identificación de subfamilia y género

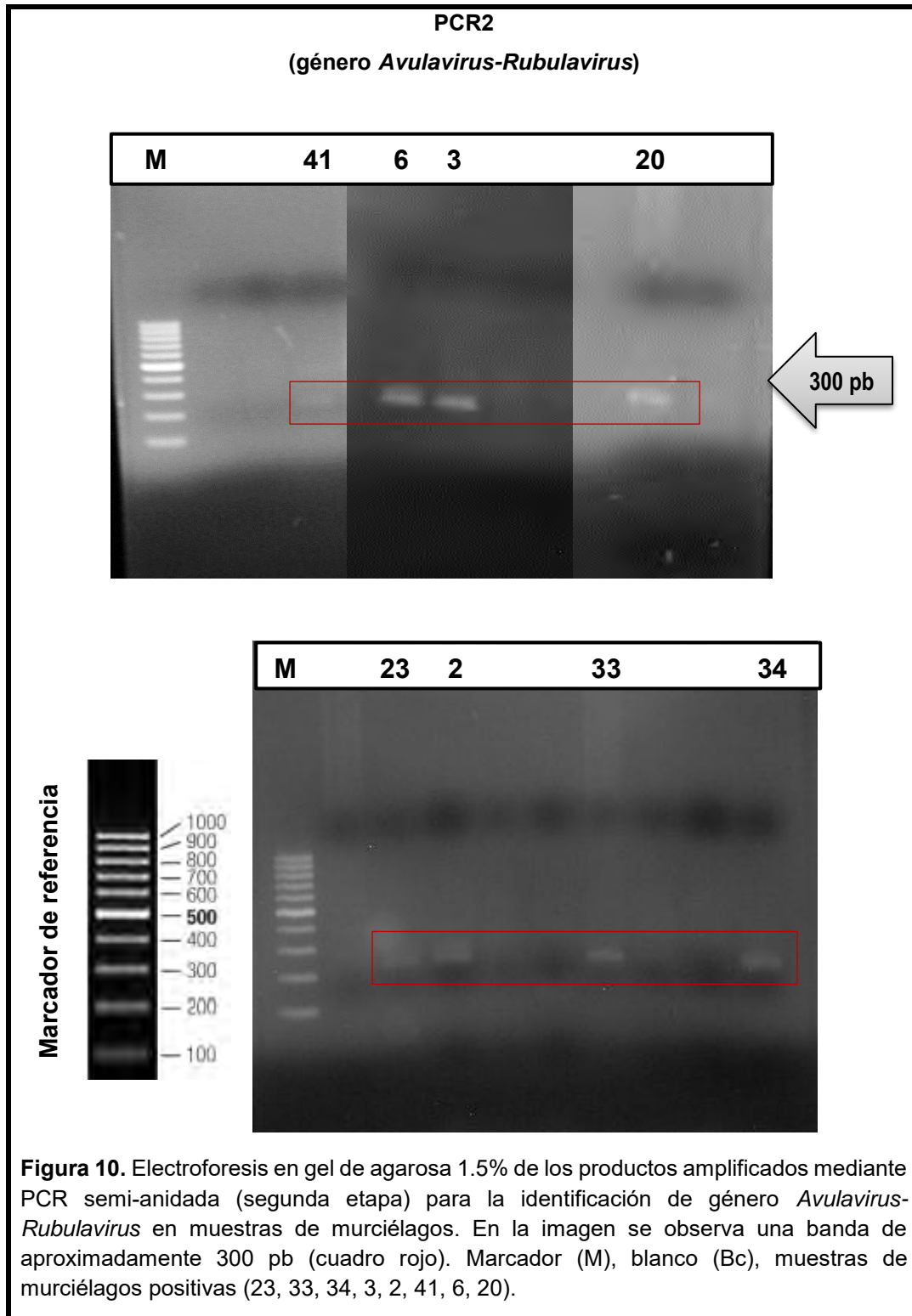
Identificación de muestra (#)	Subfamilia		Género		Género	
	<i>Paramyxovirinae</i>		<i>Avulavirus</i>		<i>Respirovirus</i>	
	PCR 1	PCR2	PCR1	PCR2	PCR1	PCR 2
<i>Tadarida brasiliensis</i> (1)			+			
<i>Tadarida brasiliensis</i> (2)			+	+		
<i>Desmodus rotundus</i> (3)				+		
<i>Pteronotus parmallii</i> (6)		+		+	-	-
<i>Artibeus hirsutus</i> (18)		+	+		-	-
<i>Artibeus hirsutus</i> (20)		+		+	-	-
<i>Artibeus hirsutus</i> (23)			+	+		
<i>Artibeus hirsutus</i> (28)			+			
<i>Artibeus hirsutus</i> (33)	+	+	+	+	-	-
<i>Artibeus hirsutus</i> (34)	+	+	+	+	-	-
<i>Sturnira lilium</i> (41)	+	+	+	+	-	-





Las bandas de los productos amplificados (Figuras, 7 y 8) corresponden al tamaño esperado <600 pb para la subfamilia *Paramyxoviridae* (primer etapa) y >500 pb (segunda etapa).





Las bandas de los productos amplificados (Figuras 9 y 10) corresponden al tamaño esperado <300 pb para género *Avulavirus-Rubulavirus*.

6.3 Aislamiento viral

Los resultados obtenidos de los tres especímenes de murciélagos empleados para las pruebas de aislamiento viral incluyendo tejidos de cerebro, pulmón y riñón de cada murciélago; solamente se logró el aislamiento de un virus con capacidad hemaglutinante con eritrocitos de pollo (0.05%) del murciélago 41 (*Sturnira lilium*) (Figura 11). El cultivo celular infectado con los diferentes tejidos no mostró efecto citopático (formación de sincitios) en ninguno de los pases celulares realizados. Cada pase fue evaluado mediante la prueba de HA y PCR.



6.3.1 Prueba de Hemaglutinación (HA)

El efecto de aglutinación se observó hasta el segundo pase celular en muestras de cerebro, pulmón y riñón del murciélago frugívoro 41 (*Sturnira lilium*), observando la capacidad de aglutinar eritrocitos de pollo con títulos de 1:8 (cerebro) y 1:4 (pulmón y riñón).

6.3.2 Prueba de RT-PCR y PCR semi-anidada para las muestras aisladas en células VERO

Simultáneamente los aislamientos de cerebro, pulmón y riñón realizados del murciélago 41 en células VERO se trabajaron mediante RT-PCR para el gen interno de control β -actina resultando positivas, indicando la integridad del RNA obtenido (Figura 12). Posteriormente para confirmar la familia y el género se realizó la PCR semi-anidada con resultados positivos en la amplificación de un fragmento específico para el gen de la polimerasa de la subfamilia *Paramyxovirinae* género *Avulavirus-Rubulavirus* correspondientes al murciélago 41 (*Sturnira lilium*) como se mencionó anteriormente (Figura 13).

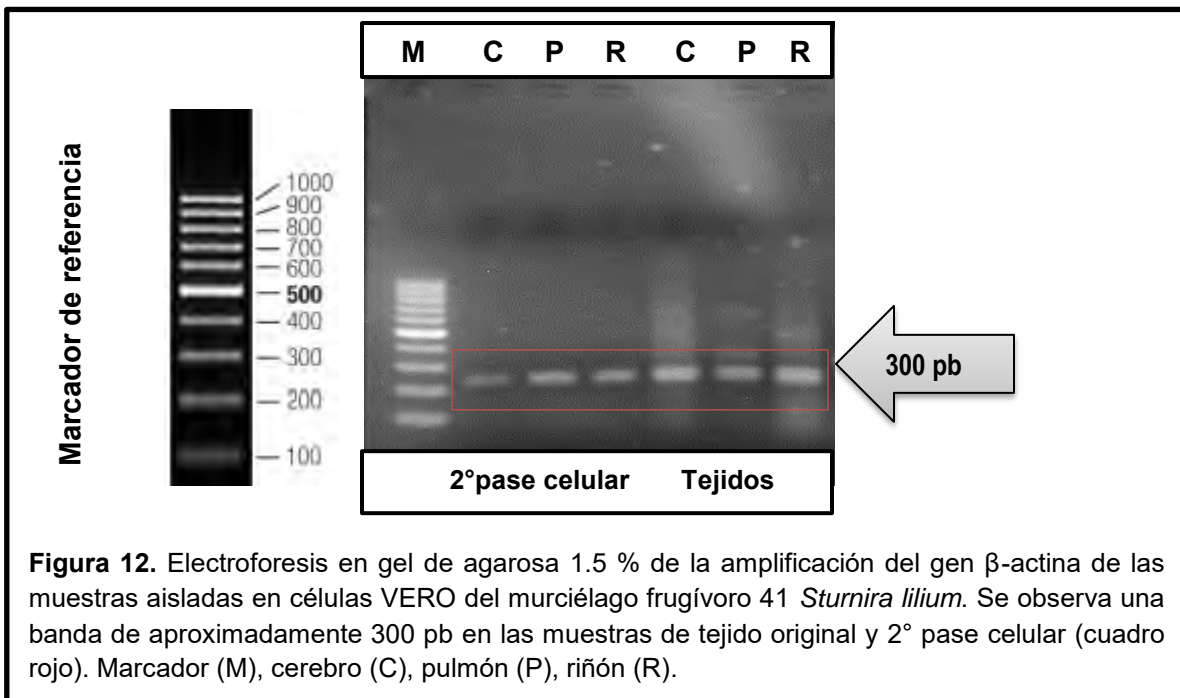
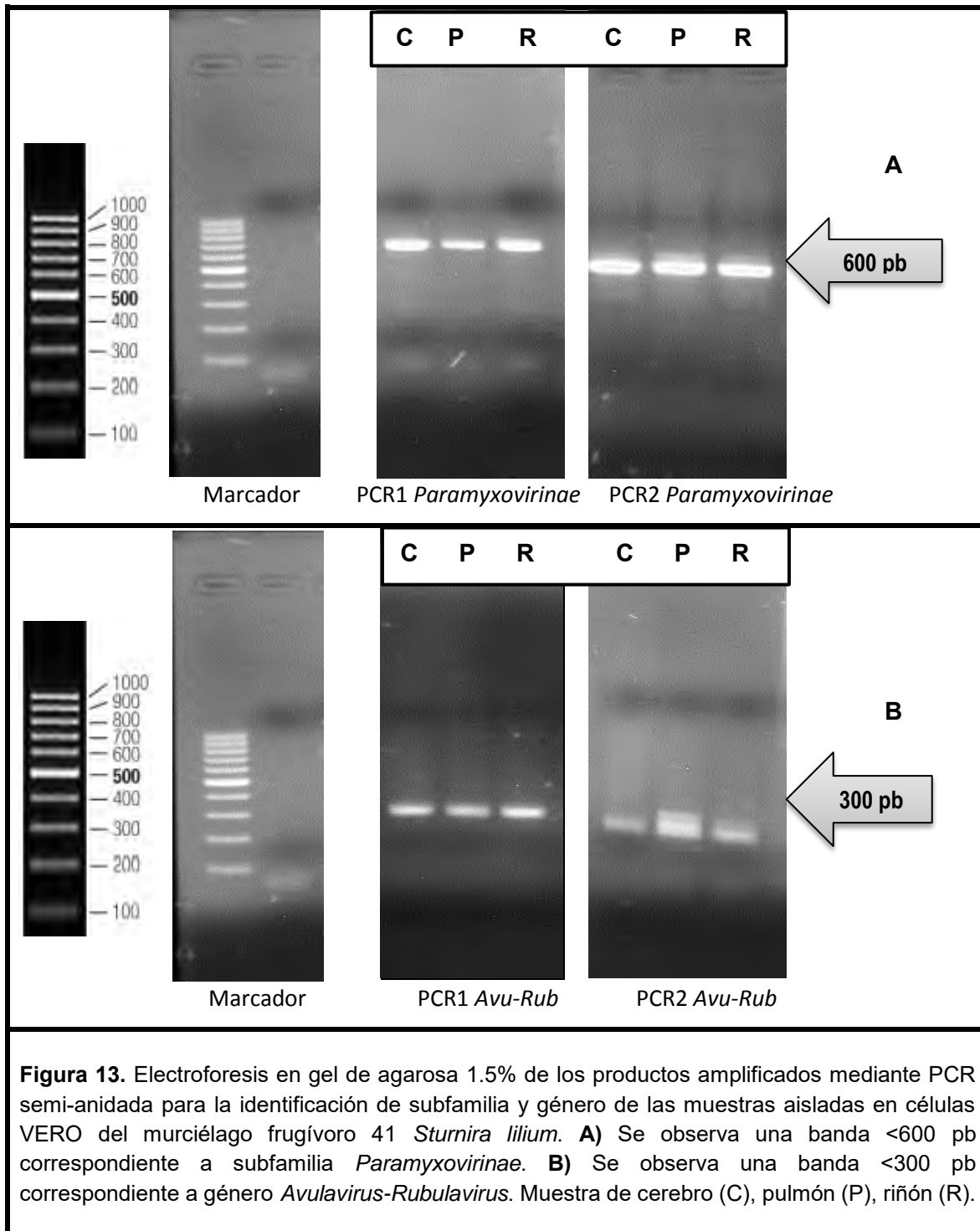
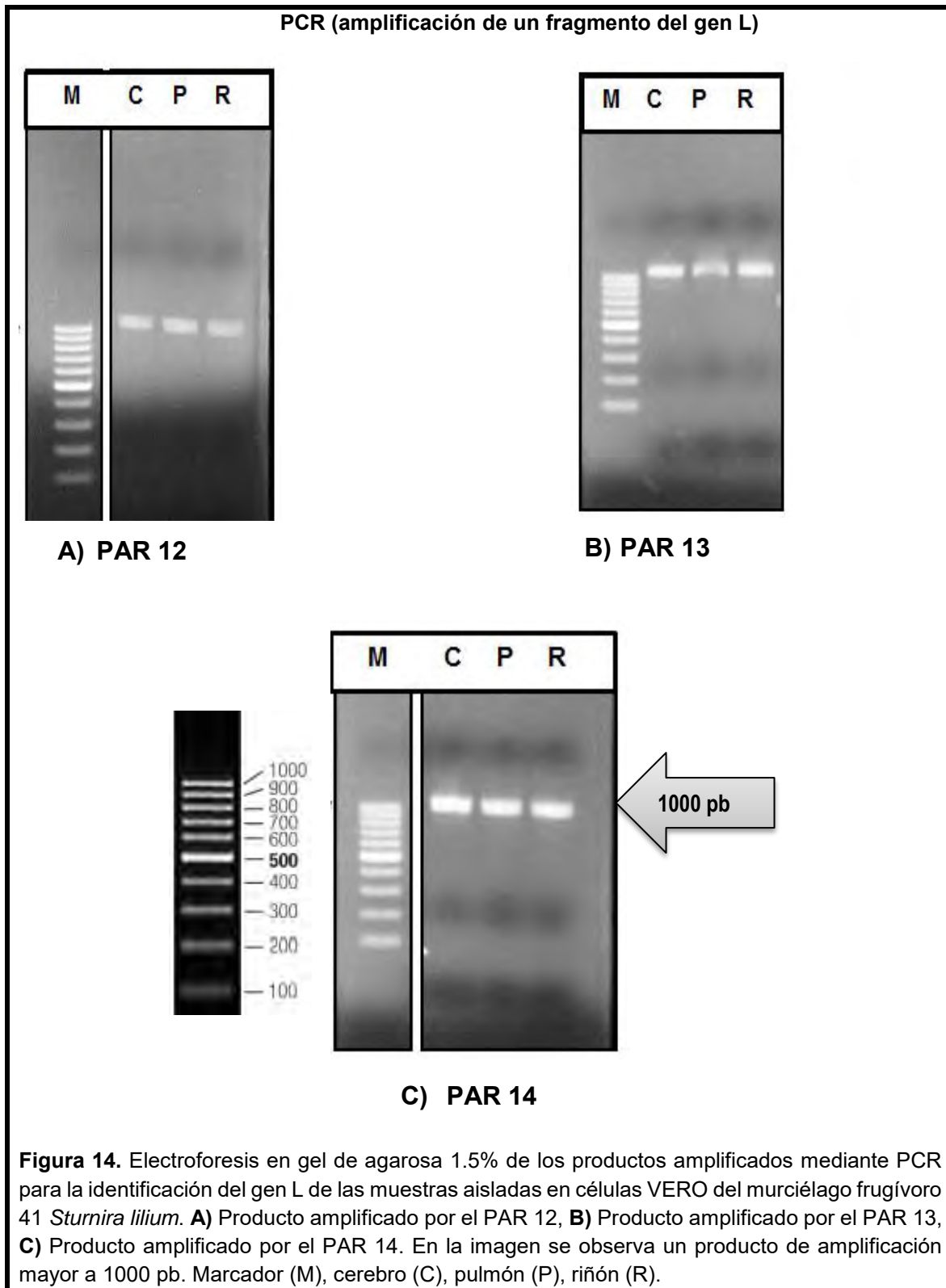


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de la amplificación del gen β -actina de las muestras aisladas en células VERO del murciélago frugívoro 41 *Sturnira lilium*. Se observa una banda de aproximadamente 300 pb en las muestras de tejido original y 2° pase celular (cuadro rojo). Marcador (M), cerebro (C), pulmón (P), riñón (R).



6.3.3 Amplificación de la polimerasa viral y secuenciación de los productos de PCR procedentes del aislamiento

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas de aglutinación y con el antecedente de ser muestras positivas a ser PCR positivas para el género *Avulavirus-Rubulavirus*. A partir del 2° pase celular se realizó la confirmación de la presencia de la polimerasa viral (gen L) utilizando un set de 3 juegos de iniciadores referenciados como: PAR 12, PAR 13, y PAR 14 (Cuevas *et al*, 2016) correspondientes a un *Rubulavirus*, obteniendo así la amplificación de tres fragmentos de aproximadamente 1000 pb (Figura 14) los cuales fueron purificados y enviados a secuenciar para su análisis.



6.3.4 Análisis bioinformático de las secuencias

La secuencia consenso de aproximadamente 2835 nucleótidos de cada tejido fue sometida a un alineamiento mediante BLAST, los resultados muestran un 99% de identidad con la polimerasa del PorPV y del 73% de identidad con la polimerasa del virus Menangle.

La secuencia de aproximadamente 940 aminoácidos de cada tejido fue comparada con la secuencia del gen L de diversos paramixovirus, identificándose el péptido GDNQ (Figura 15) además se realizó un alineamiento con la secuencia de la polimerasa del PorPV para identificar posibles variaciones (Figura 16) encontrándose 15 aminoácidos sustituidos en los aislamientos.

El árbol filogenético se construyó mediante el método neighbour-joining empleándose las secuencias obtenidas de este trabajo y secuencias registradas de diferentes miembros de la familia *Paramyxoviridae* (Figura 17).

Hendra	I	V	Q	G	D	N	E	S	I	A	I
Nipah	I	V	Q	G	D	N	E	S	I	A	I
LPMV	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V
Mapuera	M	V	Q	G	D	N	Q	V	I	A	V
Mumps	M	V	Q	G	D	N	Q	A	I	A	I
Menangle	L	V	Q	G	D	N	Q	A	M	A	I
Tioman	L	V	Q	G	D	N	Q	A	M	A	I
HPIV-3	M	V	Q	G	D	N	Q	A	I	A	V
Sendai	M	V	Q	G	D	N	Q	A	I	A	V
VSV	M	V	Q	G	D	N	Q	A	I	A	V
NDV	M	V	Q	G	D	N	Q	V	I	A	V
Measles	L	V	Q	G	D	N	Q	T	I	A	V
CDV	L	V	Q	G	D	N	Q	T	I	A	V
Cerebro M41	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V
Pulmón M41	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V
Riñón M41	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V

Figura 15. Alineamiento de las secuencias obtenidas. En la imagen se observa la presencia del segmento conservado de la polimerasa viral GDNQ en el murciélago *Sturnira lilium* (color amarillo) El alineamiento de aminoácidos fue construido con base en la secuencia del gen de la polimerasa de los mononegavirales. El cuadro rojo muestra el cambio de Q por E en HeV y NiV.

“Identificación de la polimerasa viral (gen L) de virus de la familia Paramyxoviridae en muestras de Murciélagos

LPMV	Q	F	S	R	D	E	A	Y	V	I	V	E	K	L	T	S	L	Y	G	G	L	S	P	D	L	
CER B41	Q	F	S	R	D	E	A	Y	V	I	V	E	K	L	T	S	L	Y	G	G	L	S	P	D	L	
PUL B41	Y	I	S	R	D	E	A	Y	V	I	V	E	K	L	T	S	L	Y	G	G	L	S	P	D	L	
RIN B41	G	I	S	R	E	G	A	Y	V	I	V	E	K	L	T	S	L	Y	G	G	L	S	P	D	L	
LPMV	T	A	E	L	L	C	L	M	R	L	W	G	H	P	S	L	V	A	A	Q	A	A	G	K	V	
CER B41	T	A	E	L	L	C	L	M	R	L	W	G	H	P	S	L	V	A	A	Q	A	A	G	Q	V	
PUL B41	T	A	E	L	L	C	L	M	R	L	W	G	H	P	S	L	V	A	A	Q	A	A	G	Q	V	
RIN B41	T	A	E	L	L	C	L	M	R	L	W	G	H	P	S	L	V	A	A	Q	A	A	G	Q	V	
LPMV	R	E	S	M	C	A	A	K	V	I	Q	L	G	V	T	L	K	T	L	A	F	F	H	T	I	
CER B41	R	E	S	M	C	A	A	K	V	I	Q	L	G	V	T	L	K	T	L	A	F	F	H	T	I	
PUL B41	R	E	S	M	C	A	A	K	V	I	Q	L	G	V	T	L	K	T	L	A	F	F	H	T	I	
RIN B41	R	E	S	M	C	A	A	K	V	I	Q	L	G	V	T	L	K	T	L	A	F	F	H	T	I	
LPMV	L	I	N	G	Y	R	R	R	H	N	G	I	W	P	P	V	H	L	P	E	Y	A	P	L	A	
CER B41	L	I	N	G	Y	R	R	R	H	N	G	I	W	P	P	V	H	L	P	E	Y	A	P	L	A	
PUL B41	L	I	N	G	Y	R	R	R	H	N	G	I	W	P	P	V	H	L	P	E	Y	A	P	L	A	
RIN B41	L	I	N	G	Y	R	R	R	H	N	G	I	W	P	P	V	H	L	P	E	Y	A	P	L	A	
LPMV	L	V	E	L	C	K	D	N	H	E	I	T	Y	D	F	T	L	R	H	W	K	A	I	S	A	
CER B41	L	V	E	L	C	K	D	N	H	E	I	T	Y	D	F	T	L	R	H	W	K	A	I	S	A	
PUL B41	L	V	E	L	C	K	D	N	H	E	I	T	Y	D	F	T	L	R	H	W	K	A	I	S	A	
RIN B41	L	V	E	L	C	K	D	N	H	E	I	T	Y	D	F	T	L	R	H	W	K	A	I	S	A	
LPMV	I	Q	F	E	R	C	F	D	A	D	P	G	E	D	L	S	I	F	M	K	D	K	A	I	S	
CER B41	I	Q	F	E	R	C	F	D	A	D	P	G	E	D	L	S	I	F	M	K	D	K	A	I	S	
PUL B41	I	Q	F	E	R	C	F	D	A	D	P	G	E	D	L	S	I	F	M	K	D	K	A	I	S	
RIN B41	I	Q	F	E	R	C	F	D	A	D	P	G	E	D	L	S	I	F	M	K	D	K	A	I	S	
LPMV	C	P	K	Q	D	W	M	S	V	F	R	K	S	L	I	K	D	R	F	T	A	A	K	R	D	
CER B41	C	P	K	Q	D	W	M	S	V	F	R	K	S	L	I	K	D	R	F	T	A	A	K	R	D	
PUL B41	C	P	K	Q	D	W	M	S	V	F	R	K	S	L	I	K	D	R	F	T	A	A	K	R	D	
RIN B41	C	P	K	Q	D	W	M	S	V	F	R	K	S	L	I	K	D	R	F	T	A	A	K	R	D	
LPMV	L	P	Q	P	V	N	R	R	L	L	L	N	F	L	E	D	A	N	F	D	P	V	E	E	L	
CER B41	L	P	Q	P	V	N	R	R	L	L	L	N	F	L	E	D	A	N	F	D	P	V	E	E	L	
PUL B41	L	P	Q	P	V	N	R	R	L	L	L	N	F	L	E	D	A	N	F	D	P	V	E	E	L	
RIN B41	L	P	Q	P	V	N	R	R	L	L	L	N	F	L	E	D	A	N	F	D	P	V	E	E	L	
LPMV	K	Y	V	T	T	R	A	Y	L	T	D	D	E	F	C	A	S	Y	S	L	K	E	K	E	I	
CER B41	K	Y	V	T	T	R	A	Y	L	T	D	D	E	F	C	A	S	Y	S	L	K	E	K	E	I	
PUL B41	K	Y	V	T	T	R	A	Y	L	T	D	D	E	F	C	A	S	Y	S	L	K	E	K	E	I	
RIN B41	K	Y	V	T	T	R	A	Y	L	T	D	D	E	F	C	A	S	Y	S	L	K	E	K	E	I	
LPMV	K	T	T	G	R	I	F	A	K	L	T	R	R	M	R	S	C	Q	V	I	A	E	A	M	L	
CER B41	K	T	T	G	R	I	F	A	K	L	T	R	R	M	R	S	C	Q	V	I	A	E	A	M	L	
PUL B41	K	T	T	G	R	I	F	A	K	L	T	R	R	M	R	S	C	Q	V	I	A	E	A	M	L	
RIN B41	K	T	T	G	R	I	F	A	K	L	T	R	R	M	R	S	C	Q	V	I	A	E	A	M	L	

“Identificación de la polimerasa viral (gen L) de virus de la familia Paramyxoviridae en muestras de Murciélagos

LPMV	A	N	H	A	G	K	L	M	R	E	N	G	V	V	M	D	Q	L	K	L	T	K	S	L	L
CER B41	A	N	H	A	G	K	L	M	R	E	N	G	V	V	M	D	Q	L	K	L	T	K	S	L	L
PUL B41	A	N	H	A	G	K	L	M	R	E	N	G	V	V	M	D	Q	L	K	L	T	K	S	L	L
RIN B41	A	N	H	A	G	K	L	M	R	E	N	G	V	V	M	D	Q	L	K	L	T	K	S	L	L
LPMV	T	M	N	Q	I	G	I	V	S	Q	K	S	R	K	F	T	S	D	N	Q	T	I	F	K	R
CER B41	T	M	N	Q	I	G	I	V	S	Q	K	S	R	K	F	T	S	D	N	Q	T	I	F	K	R
PUL B41	T	M	N	Q	I	G	I	V	S	Q	K	S	R	K	F	T	S	D	N	W	T	I	F	K	R
RIN B41	T	M	N	Q	I	G	I	V	S	Q	K	S	R	K	F	T	S	D	N	Q	T	I	F	K	R
LPMV	P	N	R	S	N	Q	G	K	T	A	N	R	D	T	Q	R	D	S	D	E	H	E	I	A	A
CER B41	P	N	R	S	N	Q	G	K	T	A	N	R	D	T	Q	R	D	S	D	E	H	E	I	A	A
PUL B41	P	N	R	S	N	Q	G	K	T	A	N	R	D	T	Q	R	D	S	D	E	H	E	I	A	A
RIN B41	P	N	R	S	N	Q	G	K	T	A	N	R	D	T	Q	R	D	S	D	E	H	E	I	A	A
LPMV	C	F	L	T	T	D	L	K	K	Y	C	L	Q	W	R	Y	Q	S	I	G	M	F	A	R	S
CER B41	C	F	L	A	S	D	L	K	K	Y	C	I	Q	W	R	Y	Q	S	I	V	M	F	A	R	S
PUL B41	C	F	L	T	T	D	L	K	K	Y	C	L	Q	W	R	Y	Q	S	I	V	M	F	A	R	S
RIN B41	C	F	L	T	T	D	L	K	I	H	C	L	Q	W	R	Y	Q	S	I	V	M	F	A	R	S
LPMV	L	N	Q	M	Y	G	Y	D	H	L	F	E	W	I	H	L	R	L	M	R	S	T	L	Y	V
CER B41	L	N	Q	M	Y	G	Y	D	H	L	F	E	W	I	H	L	R	L	M	R	S	T	L	Y	V
PUL B41	L	N	Q	M	Y	G	Y	D	H	L	F	E	W	I	H	L	R	L	M	R	S	T	L	Y	V
RIN B41	L	N	Q	M	Y	G	Y	D	H	L	F	E	W	I	H	L	R	L	M	R	S	T	L	Y	V
LPMV	G	D	P	F	N	P	P	E	A	G	T	D	F	D	L	D	S	V	-	N	G	D	I	F	I
CER B41	G	D	P	F	N	P	P	E	A	G	T	D	F	D	L	D	G	V	V	N	G	D	I	F	I
PUL B41	G	D	P	F	N	P	P	E	A	G	T	D	F	D	L	D	G	V	V	N	G	D	I	F	I
RIN B41	G	D	P	F	N	P	P	E	A	G	T	D	F	D	L	D	G	V	V	N	G	D	I	F	I
LPMV	V	S	P	R	G	G	I	E	G	L	C	Q	K	F	W	T	M	I	S	I	S	V	I	L	L
CER B41	V	S	P	R	G	G	I	E	G	L	C	Q	K	L	W	T	M	I	S	I	S	V	I	L	L
PUL B41	V	S	P	R	G	G	I	E	G	L	C	Q	K	L	W	T	M	I	S	I	S	V	I	L	L
RIN B41	V	S	P	R	G	G	I	E	G	L	C	Q	K	L	W	T	M	I	S	I	S	V	I	L	L
LPMV	S	A	A	E	S	G	H	R	V	M	S	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V	T	T	R
CER B41	S	A	A	E	S	G	H	R	V	M	S	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V	T	T	R
PUL B41	S	A	A	E	S	G	H	R	V	M	S	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V	T	T	R
RIN B41	S	A	A	E	S	G	H	R	V	M	S	M	V	Q	G	D	N	Q	V	V	A	V	T	T	R
LPMV	V	P	R	T	L	S	Q	R	D	K	K	E	I	A	H	R	A	C	L	S	F	F	N	R	L
CER B41	V	S	R	T	L	S	Q	R	D	K	K	E	I	A	H	R	A	C	L	S	F	F	N	R	L
PUL B41	V	S	R	T	L	S	Q	R	D	K	K	E	I	A	H	R	A	C	L	S	F	F	N	R	L
RIN B41	V	S	R	T	L	S	Q	R	D	K	K	E	I	A	H	R	A	C	L	S	F	F	N	R	L
LPMV	K	E	N	N	F	G	L	G	H	H	L	K	A	Q	E	T	I	I	S	S	D	F	F	V	Y
CER B41	K	E	N	N	F	G	L	G	H	H	L	K	A	Q	E	T	I	I	S	S	D	F	F	V	Y
PUL B41	K	E	N	N	F	G	L	G	H	H	L	K	A	Q	E	T	I	I	S	S	D	F	F	V	Y
RIN B41	K	E	N	N	F	G	L	G	H	H	L	K	A	Q	E	T	I	I	S	S	D	F	F	V	Y

“Identificación de la polimerasa viral (gen L) de virus de la familia Paramyxoviridae en muestras de Murciélagos

LPMV	S	K	R	V	F	F	R	G	R	I	L	N	Q	A	L	K	N	A	S	K	L	C	L	I	A	
CER B41	S	K	R	V	F	F	R	G	R	I	L	N	Q	A	L	K	N	A	S	K	L	C	L	I	A	
PUL B41	S	K	R	V	F	F	R	G	R	I	L	N	Q	A	L	K	N	A	S	K	L	C	L	I	A	
RIN B41	S	K	R	V	F	F	R	G	R	I	L	N	Q	A	L	K	N	A	S	K	L	C	L	I	A	
LPMV	D	V	L	G	D	C	S	Q	A	S	C	S	N	L	A	T	T	V	M	R	L	A	E	N	G	
CER B41	D	V	L	G	D	C	S	Q	A	S	C	S	N	L	A	T	T	V	M	R	L	A	E	N	G	
PUL B41	D	V	L	G	D	C	S	Q	A	S	C	S	N	L	A	T	T	V	M	R	L	A	E	N	G	
RIN B41	D	V	L	G	D	C	S	Q	A	S	C	S	N	L	A	T	T	V	M	R	L	A	E	N	G	
LPMV	V	E	K	D	L	C	Y	Y	L	N	V	Y	L	T	I	R	Q	V	T	Y	D	I	K	F	P	
CER B41	V	E	K	D	L	C	Y	Y	L	N	V	Y	L	T	I	R	Q	V	T	Y	D	I	K	F	P	
PUL B41	V	E	K	D	L	C	Y	Y	L	N	V	Y	L	T	I	R	Q	V	T	Y	D	I	K	F	P	
RIN B41	V	E	K	D	L	C	Y	Y	L	N	V	Y	L	T	I	R	Q	V	T	Y	D	I	K	F	P	
LPMV	Q	V	Q	T	Y	S	S	D	I	R	H	F	Y	A	N	H	P	H	L	I	A	R	L	A	V	
CER B41	Q	V	Q	T	Y	S	S	D	I	R	H	F	Y	A	N	H	P	H	L	I	A	R	L	A	V	
PUL B41	Q	V	Q	T	Y	S	S	D	I	R	H	F	Y	A	N	H	P	H	L	I	A	R	L	A	V	
RIN B41	Q	V	Q	T	Y	S	S	D	I	R	H	F	Y	A	N	H	P	H	L	I	A	R	L	A	V	
LPMV	L	P	S	Q	L	G	G	L	N	Y	L	S	C	S	R	L	F	N	R	?	Y	W	R	S	C	
CER B41	L	P	S	Q	L	G	G	L	N	Y	L	S	C	S	R	L	F	N	R	?	Y	W	R	S	C	
PUL B41	L	P	S	Q	L	G	G	L	N	Y	L	S	C	S	R	L	F	N	R	?	Y	W	R	S	C	
RIN B41	L	P	S	Q	L	G	G	L	N	Y	L	S	C	S	R	L	F	N	R	R	Y	W	R	S	C	

Figura 16. Análisis del alineamiento derivado de una porción de la proteína L (630 aminoácidos) de las muestras aisladas en células VERO del murciélago frugívoro 41 *Sturnira lilium* comparado con el virus de referencia LPMV. El alineamiento se realizó mediante el programa Mega 5.0. En la imagen se observa el inicio y término de los dominios: dominio I (cuadro negro), dominio II (cuadro azul), dominio III (cuadro rojo), dominio IV (cuadro verde). La secuencia GDNQ se encuentra marcada de color rojo y los aminoácidos substituidos de color amarillo. Los aislamientos se denotan CER B41 (cerebro), PUL B41 (pulmón) y RIN B41 (riñón).

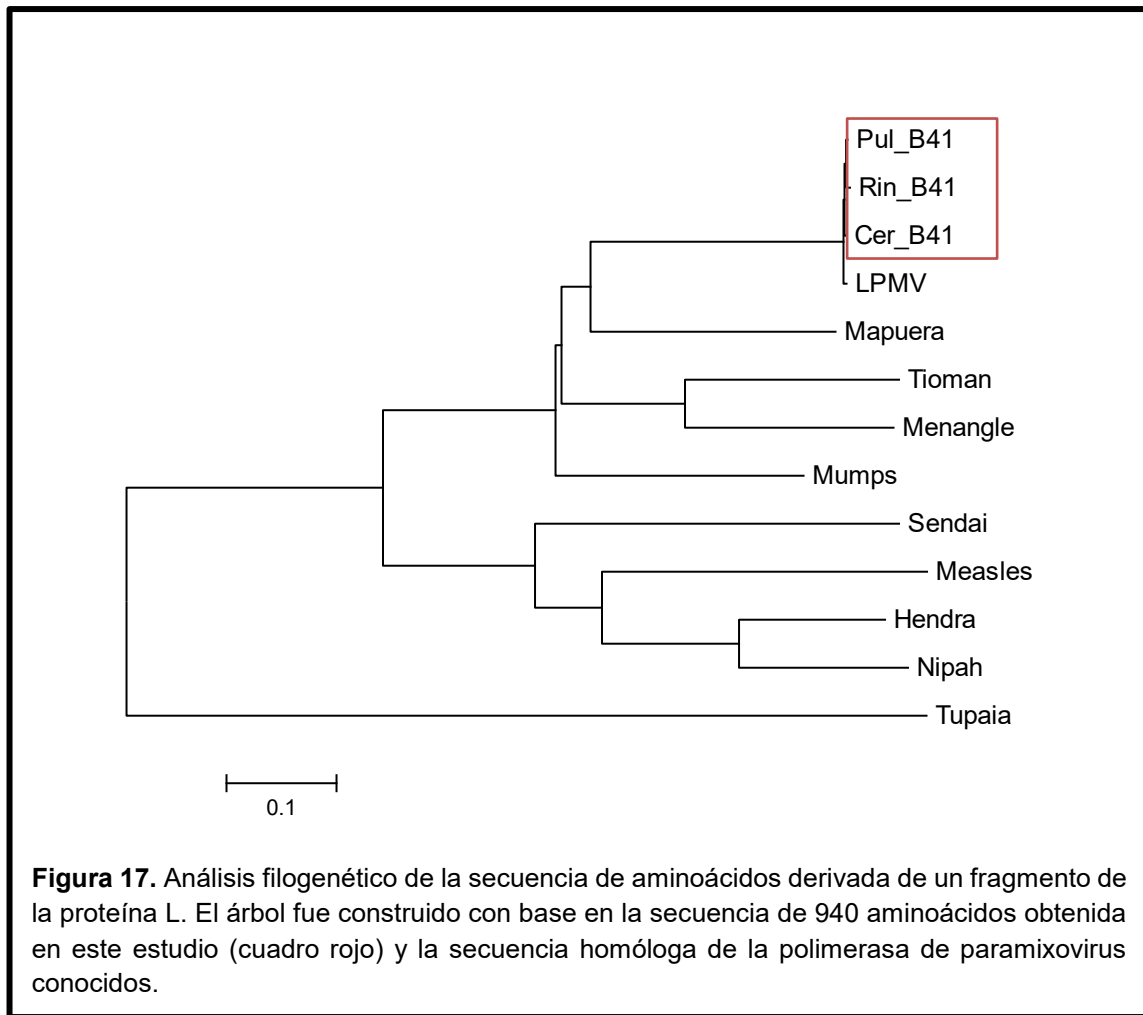
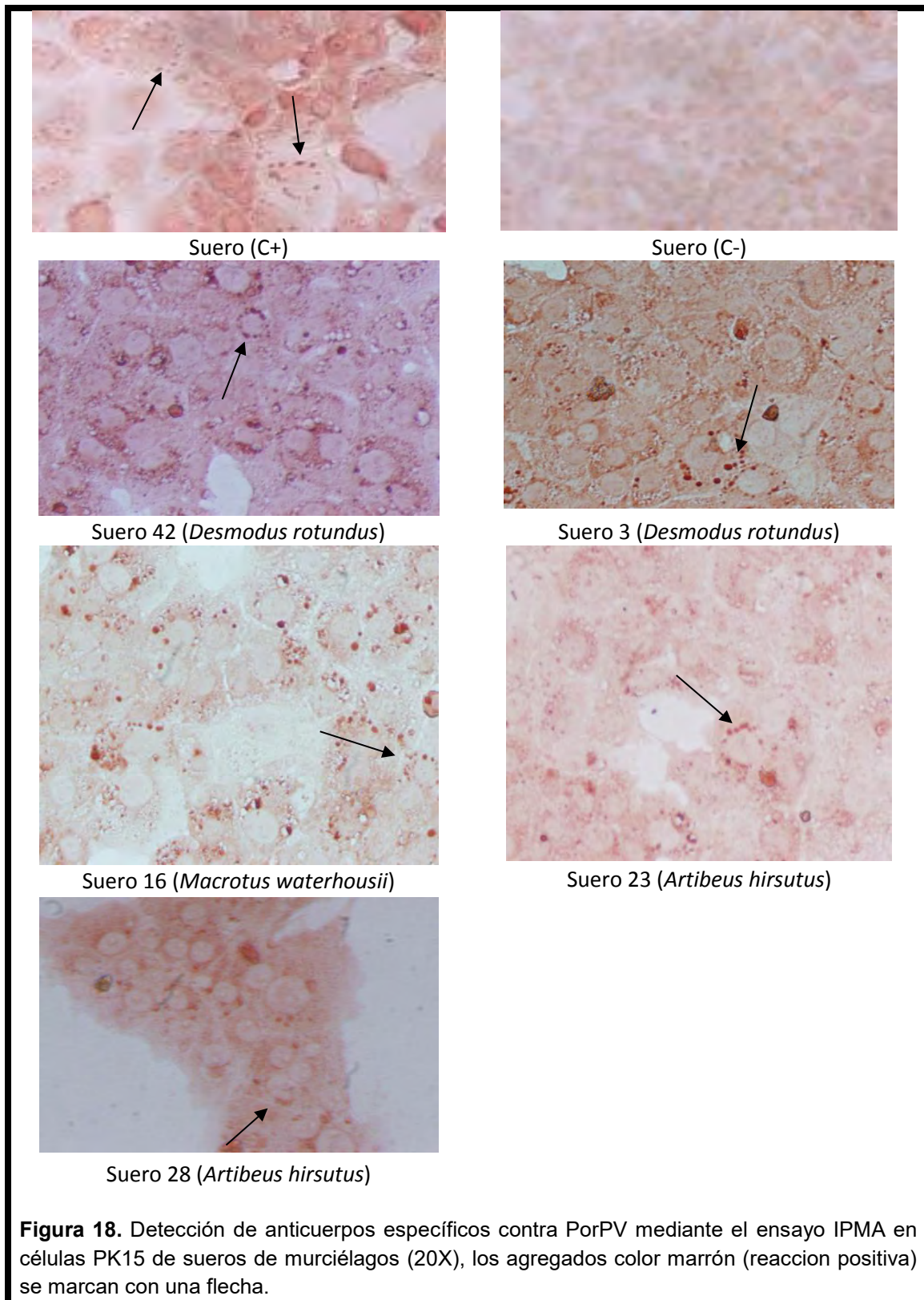


Figura 17. Análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos derivada de un fragmento de la proteína L. El árbol fue construido con base en la secuencia de 940 aminoácidos obtenida en este estudio (cuadro rojo) y la secuencia homóloga de la polimerasa de paramixovirus conocidos.

6.4 IPMA

De las 34 muestras de suero solo 19 fueron viables para el ensayo IPMA, las 15 restantes fueron descartadas debido al bajo volumen. De los 19 sueros procesados se obtuvieron 5 resultados positivos (26%) (Figura 18).



7. DISCUSIÓN

Considerando que en murciélagos han sido aislados o identificados virus de la familia *Paramyxoviridae* causantes de importantes problemas en salud humana y veterinaria (Lamb & Kolakofsky, 1996), es importante conocer el papel de los murciélagos en la transmisión de estos virus. Un estudio comparativo entre virus de murciélagos y roedores menciona que la mayoría de los virus zoonóticos son de tipo RNA de genoma segmentado y cuya replicación viral se da en el citoplasma celular comparado con virus no zoonóticos (Hayman *et al* 2013); como se mencionó anteriormente éstas son algunas de las características de los paramixovirus, además se menciona que los murciélagos albergan más virus por especie en comparación con los roedores (Hayman. *et al* 2013). El objetivo de este trabajo fue realizar la búsqueda de paramixovirus en murciélagos de diferentes especies mediante el acondicionamiento de la técnica de PCR semi-anidada.

En este trabajo las muestras de cerebro fueron evaluadas mediante el gen β -actina el cual es un gen constitutivo utilizado como control interno en RT-PCR, su identificación nos demuestra la integridad en la obtención de los RNAs. En algunos estudios del Reino Unido el análisis de la secuencia de β -actina es utilizado para identificar murciélagos de diferentes especies (Harris *et al*, 2008).

Adicionalmente se acondicionó el protocolo de PCR semi-anidada que permite identificar secuencias conservadas entre miembros de varios grupos de paramixovirus tomando como referencia los ensayos realizados por Tong *et al* en 2008. El uso de la PCR semi-anidada en la identificación de patógenos permite aumentar la sensibilidad en la detección al obtenerse un mayor número de copias del fragmento amplificado, esta técnica es recomendada cuando se tienen niveles bajos de muestra. Por medio de esta técnica se lograron identificar 6 muestras positivas a subfamilia *Paramyxovirinae* y 11 positivas para género *Avulavirus-Rubulavirus*. Es importante mencionar que solo 3 muestras del total fueron positivas a todas las pruebas de PCR, esto debido a que la sensibilidad de los dos tipos de

PCR es diferente. De acuerdo a los autores la sensibilidad de la PCR para determinar la subfamilia *Paramyxovirinae* es de 500 a 1000 copias comparado con la PCR para detectar género donde se presenta una sensibilidad de por lo menos 10 copias de RNA (Tong *et al*, en 2008). Los murciélagos positivos *Artibeus hirsutus* y *Sturnira lilium* (*Phyllostomidae*) corresponden a murciélagos frugívoros. Se sabe que de los paramixovirus encontrados en murciélagos son en mayor proporción los virus pertenecientes al género *Rubulavirus* detectados o aislados principalmente de murciélagos frugívoros (Barr *et al* 2015; Chua *et al*, 2001). La evidencia de estos hallazgos ha sugerido que los *Rubulavirus* de los murciélagos son capaces de cruzar barreras entre especies (Baker *et al* 2013; Yaiw *et al* 2007; Chant *et al* 1998).

El aislamiento viral se realizó de 3 tejidos (cerebro, pulmón y riñón) del murciélago 41 (*Sturnira lilium*) en células VERO. *Sturnira lilium* es un murciélago de la familia *Phyllostomidae* presente en América Central y Sudamérica el cual se alimenta de frutos. Esta especie ha sido relacionada con el virus Mapuera (MPRV), el cual fue aislado de glándulas salivales de un murciélago de esta especie aparentemente sano capturado en Brasil 1979 (Karabatsos, 1985). Recientemente se ha reportado la identificación de este virus en la misma especie de murciélagos (*Sturnira lilium*) en Perú (Segovia *et al*, 2016). El análisis del genoma del MPRV permitió clasificarlo dentro del género *Rubulavirus*, altamente relacionado con el PorPV (Wang *et al*, 2007).

Para detectar e identificar un virus en cultivo celular, el efecto citopático, producción de metabolitos, moléculas víricas o antígenos (García, 1998) son métodos que permiten saber si el virus se ha replicado. En nuestro caso, las células del cultivo no mostraron efecto citopático, no obstante las muestras resultaron positivas en la prueba de HA. Esta prueba rápida nos proporcionó información acerca de la presencia de un virus con actividad hemaglutinante en cada tejido, característica importante de los virus de la familia *Paramyxoviridae*. La HA permite medir las partículas virales en suspensión resultando ser una prueba útil para detectar virus que producen poco o ningún efecto citopático (Shors, 2009). Estos resultados fueron

confirmados mediante las pruebas de PCR realizadas corroborando la presencia de un paramixovirus en los aislamientos al amplificar un fragmento del gen L.

Como se mencionó anteriormente el genoma viral de los paramixovirus es de alrededor de 15 000 nucleótidos. El gen L tiene la capacidad de codificar para la proteína L, proteína menos abundante responsable de la mayoría de actividades enzimáticas involucradas en la transcripción y replicación junto con la proteína P (Banerjee, 1987 a y b). Un alineamiento de las secuencias de la proteína L de 6 paramixovirus identifico un región con una secuencia invariante correspondiente al péptido QGDNQ, en donde el péptido GDN podría representar el sitio activo de otras RNA polimerasas dependientes de RNA (Kamer & Argos, 1984). Se sabe que el gen L se encuentra organizado en dominios (I-VI). Dentro de los bloques II y III se encuentran motivos altamente conservados (motivo A, B, C, D,) esenciales para la función de polimerasa de las proteínas (Miller *et al*, 2003).

En este trabajo se obtuvo una secuencia consenso de alrededor de 2835 nucleótidos. Los resultados de la comparación de la secuencia consenso con las depositadas en el GenBank muestran una homología del 99% con la secuencia de la proteína L del PorPV observándose 15 aminoácidos substituidos; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que también se tenga aislado un virus del género *Avulavirus*, dado que los resultados de la PCR corresponden al género (*Avulavirus-Rubulavirus*) se especula que el virus aislado podría estar relacionado con el PorPV, que es un virus endémico de México de gran importancia veterinaria, responsable de la enfermedad de ojo azul de los cerdos (Stephano, 1988).

El alineamiento de la secuencia consenso se generó utilizando ClustalW, en donde se identificó el segmento GDNQ en las secuencias obtenidas corroborando la presencia de un paramixovirus; este segmento se ha identificado en la mayoría de los virus monegavirales a excepción de HeV, NiV, Virus Mossman y Paramixovirus Tupaia (Miller *et al*, 2003), en estos virus se observa un cambio en el péptido GDNQ/GDNE. Las mutaciones de este motivo en el virus de la rabia y el VSV

presentaron baja actividad enzimática de la polimerasa (Schnell & Conzelman, 1995).

Finalmente se realizó el ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa para identificar la presencia de anticuerpos en los sueros de los murciélagos utilizando como virus de referencia el PorPV. Anteriormente en 2004 un estudio serológico demostró la presencia de anticuerpos del PorPV en un murciélago en la zona de la Costa del Pacífico (Salas *et al*, 2004); sin embargo, no se logró concluir si el virus se encontraba presente en la población de murciélagos, y si existía relación genética con los aislamientos en cerdos. En este estudio se identificó la presencia de anticuerpos contra PorPV en murciélagos *Desmodus rotundus* (hematófago), *Macrotus waterhousii* (insectívoro), *Artibeus hirsutus* (frugívoro).

Los datos obtenidos de este trabajo indican una alta relación entre la secuencia correspondiente a la polimerasa viral del aislamiento (*Sturnira lilium*) con la secuencia correspondiente a la polimerasa del PorPV apoyando la hipótesis de que el PorPV pudo haber surgido a partir de murciélagos (Wang *et al* 2007).

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se lograron identificar 11 murciélagos PCR positivos a paramixovirus mediante el acondicionamiento de la PCR semi-anidada utilizando iniciadores sensibles y específicos para el gen de la polimerasa reportados por Tong *et al* en 2008.

- ❖ Se logró el aislamiento de un virus hemaglutinante de cerebro, pulmón y riñón del murciélago frugívoro *Sturnira lilium* en células VERO.

- ❖ El análisis filogenético de la secuencia obtenida corresponde al gen de la polimerasa, el cual comparte una homología del 99% con la secuencia de la polimerasa del PorPV observándose 15 aminoácidos substituidos.

- ❖ Se identificó la secuencia del péptido GDNQ en cerebro, pulmón y riñón del murciélago *Sturnira lilium* indicativo de la presencia de la polimerasa viral (gen L) altamente conservado entre virus de la familia *Paramyxoviridae*.

- ❖ La identificación de anticuerpos contra el PorPV sugiere la circulación de virus de la subfamilia *Paramyxovirinae* en la población de murciélagos, aunque la prueba de Inmunoperoxidasa es altamente específica, no se descarta la posibilidad de que exista una inmunidad cruzada entre virus del mismo género.

9. PERSPECTIVAS

El acondicionamiento de la PCR semi-anidada permitió la identificación de paramixovirus en murciélagos; sin embargo, para obtener más información acerca de los virus presentes en murciélagos se recomendaría realizar estudios más extensos que permitan identificar los virus circulantes en murciélagos mexicanos, considerando que México cuenta con una gran diversidad de especies de murciélagos.

Debido a que el cultivo no mostró efecto citopático se recomendaría realizar la prueba de inmunofluorescencia para identificar la presencia del virus. Además de realizar el IPMA utilizando como referencia el virus del aislamiento.

Asimismo, sería interesante realizar la caracterización molecular del gen completo de la polimerasa con lo cual se podrá conocer la relación genética del virus aislado con otros paramixovirus de murciélagos y sus posibles mutaciones.

10. REFERENCIAS

- Alcántara, O. M., Gonzáles, Del A. A., Velázquez, J. (2012). Anexo III Fundamentos y Aplicaciones de las principales técnicas de diagnóstico molecular en enfermedades mendelianas. En *Genética Clínica. Manual Moderno*. p. 392.
- Baer, G. M. (1991). *The natural history of rabies. 2 ed. CRS Press*. Boca Raton, Florida.
- Baker, K. S., Todd, S., Marsh, G. A., Crameri, G., Barr, J., Kamins, A. O., Peel, A. J., Yu, M., Hayman, D. T., Nadjm, B., Mtove, G., Amos, B., Reyburn, H., Nyarko, E., Suu-Ire, R., Murcia, P. R., Cunningham, A. A., Wood, J. L., Wang, L. (2013). Novel, potentially zoonotic paramyxoviruses from the African Straw-Colored Fruit Bat *Eidolon helvum*. *J Virol* 87, 1348–1358.
- Banerjee, A. K. (1987a). Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiological Reviews*. 51, 66-87.
- Banerjee, A. K. (1987b). The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell*. 48, 363-364.
- Barr, J. A., Smith, C., Smith, I., D, Jong. C., Todd. S., Melville, D., Broos, A., Crameri, S., Haining, J., Marsh, G., Crameri, G., Field, H., Wang, L. F. (2015). Isolation of multiple novel paramyxoviruses from pteropid bat urine. *J Gen Virol* 96, 24–29.
- Bergillos, G. F. & Rivas, F. M. (2013). *Toxicología clínica, lesiones por picaduras y mordeduras de animales II*. Bubok. España. p. 798.
- Calisher, C. H. (2015). Viruses in bats: a historic review. In Wang. L. F. *Bats and viruses: from pathogen discovery to host genomics*. John Wiley & Sons. New York.
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K, V. & Schountz, T. (2006). Bats: important reservoir host of merging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 19 (3), 531-545.
- Chant, K., Chan, R., Smith, M., Dwyer, D. E. & Kirkland, P. (1998). Probable human infection with a newly described virus in the family *Paramyxoviridae*. The NSW Expert Group. *Emerg. Infect. Dis*. 4, 273-275.
- Chua, K. B., Bellini, W. J., Rota, P. A., Harcourt, B. H., Tamin, A., Lam, S. K., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R., Shieh, W., Goldsmith, C. S., Gubler, D. J., Roehrig, J. T., Eaton, B., Gould, A. R., Olson, J., Field, H., *et al* Mahy, B. W. (2000). Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288(5470), 1432-1435.

- Chua, K. B., Wang, L.F., Lam, S. K., Cramer, G., Yu, M., Wise, T., Boyle, D., Hyatt, A. D., Eaton, B. T. (2001) Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia. *Virology*. 283(2), 215-229.
- Chua, K. B., Wang, L. F., Lam, S. K., Eaton, B. T. (2002) Full length genome sequence of Tioman virus, a novel paramyxovirus in the genus *Rubulavirus* isolated from fruit bats in Malaysia. *Arch. Virol.* 147, 1323-1348.
- Córdova, J. A., Valdespino, J. L. & Ponce De León, S. (2010). La epidemia de influenza A H1N1 en México. Editorial Médica Panamericana. México. p. 54.
- Cox, R. & Plemper, R. K. (2015). The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Frontiers in Microbiology*. 6, 459.
- Cuevas-Romero, S., Rivera-Benítez, J. F., Blomström, A. L., Ramliden, M., Hernández-Baumgarten, E., Hernández-Jáuregui, P., Ramírez-Mendoza, H., Berg, M. (2016). Molecular characterisation of Porcine rubulavirus (PorPV) isolates from different outbreaks in Mexico. *Virus Genes* 52, 81–90.
- Cuevas-Romero, S. & Morales-Ruiz. J. (2016). Manual para diferenciar entre murciélagos benéficos y hematófagos. Centro de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal. INIFAP. México. pp. 4-24.
- Drexler, J. F., Corman, V. M., Müller, M. A., Maganga, G. D., Vallo, P., Maisner, A., Franke, R., Herrler, G., et al Drost, C. (2012). Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat. Commu.* 3, 796.
- Fenton, M. B. (2015). Bats a world of science and mystery. The University of Chicago Press. Chicago. p 303.
- García, R. J. & Picazo, J. J. (1998). Microbiología Médica: Clínica. 2 ed. Harcourt Brace. España. pp 16-20.
- González, H. A. (2010). Principios de bioquímica clínica y patología molecular. Elsevier. España. p. 39.
- Halpin, K., Young, P. L., Field, H. & Mackenzie, J. S. (2000). Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J Gen Virol* 81, 1927-1932.
- Harris, S. L., Johnson, N., Brookes, S. M., Hutson, A. M., Fooks, A. R. & Jones, G. (2008). The application of genetic markers for EBLV surveillance in European bats species. *Dev. Biol.* 131, 347-363.
- Hayman, D.T. S., Luis, A. D., O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., et al. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bat special?. *Proc. R. Soc. B.* 280, 1-9.

- Jack, P. J., Boyle, D. B., Eaton, B. T., Wang, L. F. (2005). The complete genome sequence of J virus reveals a unique genome structure in the family *Paramyxoviridae*. *Journal of Virology*, 79, 10690-10700.
- Kamer, G. & Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 7269-7282.
- Karabatsos, N. (1985). International Catalogue of Arboviruses. 3ed. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. San Antonio Texas.
- Kavya, S. R. (2015). PCR Technique with its Application. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. 4, 1-12.
- Lamb, R. A. & Kolakosfsky, D. (1996) Paramyxoviridae: The virus and their replication. In B. N. Fieles, D. M. Knipe, & P. M. Hawley. *Virology*. 3 ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia-Nueva York. pp. 1177-1204.
- Lamb, R. A. & Paterson, R. G. (1991). The nonstructural proteins of paramyxoviruses. In. D. W. Kingsbury (Eds). *The Paramyxoviruses*. Plenum. New York. pp. 181-214.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., Wong, S. S., Leung, S. Y., Chan, K. H. & Yuen, K. Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 102, 14040-14045.
- Leroy, E. M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassain, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J. T., Gonzalez, J. P. & Swanepoel, R. (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 438, 575-576.
- Memish, Z. A., Mishra, N., Olival, K. J., Fagbo, S. F., Kapoo, V., Epstein, J. H., Alhakeemm, R., Durosinioun, A., Asmari, M. A., Islam, A., Kapoor, A., Briese, T., Daszak, P., Rabeeah, A. A. & Lipkin, W. I. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis*. 19, 1819-1823.
- Miller, P. J., Boyle, D. B., Eaton, B. T., Wang, L. F. (2003). Full length genome sequence of Mossman virus, a novel paramyxovirus isolated from rodents in Australia. *Virology*. 317, 330-344.
- Moratelli, R. & Calisher, H. C. (2015). Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 110, 1-22.
- Papenfuss, A. T., Baker, M. L., Feng, Z. P., Tachedjian, M., Crameri, G., Cowled,

- C., Ng, J., Janardhana, V., Field, H. E., Wang, L. F. (2012). The immune gene repertoire of an important viral reservoir, the Australian black flying-fox. *BMC Genomics* 13, 261.
- Philbey, A. W., Kirkland P. D., Ross, A. D., Davis, R. J., Gleeson, A. B., Love, R. J., Daniels, P. W., Gould, A. R. & Hyatt, A. D. (1998). An apparently new virus (family *Paramyxoviridae*) infectious for pigs, humans, and fruit bats. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 269-271.
- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L. & Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J. Gen. Virol.* 71(5), 1153-1162.
- Raff, T., Van Der Giet, M., Endemann, D., Wiederholt, T., P, M. (1997). Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Biotechniques.* 23 (3), 456-460.
- Reynes, J. M., Counor, D., Ong S., Faure C., Seng V., Molia S., Walston J., Georges-Courbot M. C., Deubel V., Sarthou, J. L. (2005). Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 11, 1042-1047.
- Rivera-Benítez. J. F., Martínez-Bautista. R., García-Contreras. A. D., Escobar, C., Reyes-Leyva. J., Hernández, J. & Ramírez-Mendoza. H. (2010). *21 st IPVS Congress, Vancouver. Canada.*
- Salas-Rojas, M., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, A. L., Scschnell, G. D., Schmid, R. K. & Aguilar-Setien, A. (2004). Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of México. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98(10), 577-578.
- Salazar, M. A., Sandoval, R. A., Armendáriz, B. J. (2013). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* Mc Graw Hill. México. pp 151-153.
- Santos, G., Vallejo, V., L, L., Rendon, G., Reves. J. (2011). Surgimiento y resurgimiento de Infecciones virales, *Interciencia*, 36:1. Disponible en w.interciencia.org/v36_01/022.pdf. (12 de Agosto de 2015).
- Schnell, M. J. & Conzelmann, K. K. (1995). Polymerase activity of *in vitro* mutated rabies virus L protein. *Virology.* 214, 522-530.
- Segovia, H., Salmon-Mulanovich, G., M, G. B., Silva, M., Maturrano, H. L., G, B. D. (2016). Prevalencia de Paramixovirus en Murciélagos en seis zonas de Madre de Dios y Puno, Perú, con Dos Grados de Perturbación Antropogénica. *Rev Inv Vet Perú.* 27(2), 241-251.

- Sendow, I., Field, H. J., Curran, D. C., Morrissy, G., Meehan, T. & P, D. (2006). Henipavirus in *Pteropus vampyrus* bats in Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 711–712.
- Shors, T. (2009) Virus: estudio molecular con orientación clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp 91, 97-98.
- Sleat, D. E & Banerjee, A. K. (1993). Transcriptional activity and mutational analysis of recombinant vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *J. Virol.* 67(3), 1334-1339.
- Stephano, H. A., Gay, G. M. & Ramírez, T. C. (1998). Encephalomyelitis, reproductive failure and conical opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet. Rec Sci.* 122(1):6-10.
- Tong, S., Chern, S-W., Li, Y., Pallansch, M. A. & Anderson, L. J. (2008). Sensitive and Broadly Reverse Transcription-PCR assays To Detect Novel Paramyxoviruses, *J of Clin Microbiol.* 46(8): 2652-2658.
- Traversa, M. (2005). Las enfermedades zoonosis. *Revisión bibliográfica*. Disponible en <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Salud%20Animal520y%20Salud%20Publica/2010/LAS%20ENFERMEDADES%20ZOONOSIS.pdf> (12 de Agosto de 2015).
- Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Boongird, K., Wanghongsa, S., Chanhom, L., Rollen, P., Stockton, P., Rupprecht, C. E., Ksiazek, T. G. & Hemachudha, T. (2005). Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 11, 1949-1951.
- Wang, L. F., Collins, P. L., Lamb, R. A., Randall, R. E., Rima, B. K. (2011). Paramyxoviridae. In: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E.J. (Eds). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. CA. pp 640-653.
- Wang, L. F., Hansson, E., Yu, M., Chua, K. B., Mathe, N., Cramer, G., Rima, B. K., Moreno-Lopez, J. (2007). Full-length genome and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. *Arch. Virol.* 152(7), 1259-1271.
- Wilson, D. E. (1973). Bat faunas a trophic comparison. *Systematic Zoology.* 22, 14-29.
- Witte, E. J. (1954). Bat rabies in Pennsylvania. *Am J Public Health Nations Health.* 44, 186-187.

- Yaiw, K. C., Cramer, G., Wang, L. F., Chong, H. T., Chua, K. B., Tan, C. T., Goh, K. J., Shamala, D. & Wong, K. T. (2007). Serological evidence of possible human infection with Tioman virus a newly described paramyxovirus of bat origin. *J Infect Dis* 196, 884–886.
- Young, P. L., Halpin, K., Selleck, H., Field, J. L., Gravel, M. A., Machenzie, J. S. (1996). Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 239-240.