



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PREVALENCIA DE FLAVIVIRUS EN AVES MIGRATORIAS Y RESIDENTES Y LA
ESTRUCTURA DINÁMICA DE LA COMUNIDAD EN BAHÍA DE KINO, SONORA,
MÉXICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
PAULINA ÁLVAREZ MENDIZÁBAL

TUTOR PRINCIPAL:
GERARDO SUZÁN AZPIRI
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR:
GABRIEL ERNESTO GARCÍA PEÑA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRACEY GOLDSTEIN
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2018



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.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract.....	5
Introducción.....	7
Antecedentes.....	7
Los flavivirus y las aves silvestres.....	9
La aproximación de las metacomunidades.....	11
Objetivos	14
Revisión de la literatura.....	15
1. Los flavivirus.....	15
1.1 Virus del Oeste del Nilo.....	18
1.2 Virus de la Encefalitis de San Luis.....	21
2. Los flavivirus en comunidades de aves en México.....	23
Capítulo 1.	25
Metacommunities of birds and rodents and the potential for West Nile Virus transmission	
Capítulo 2.	41
Molecular survey of mosquito-borne flaviviruses in wild birds of the Sonoran Desert, Mexico	
Discusión General	59
Referencias.....	64

Resumen

En las últimas décadas se ha observado que la mayoría de las enfermedades zoonóticas emerge en lugares que albergan una alta diversidad de especies. A su vez, una alta diversidad de especies puede producir una disminución en la transmisión de patógenos, por ejemplo, al regular la abundancia de un hospedero reservorio. Esta relación entre la emergencia de patógenos zoonóticos y la diversidad de especies ha sido documentada en diversos estudios y ha resaltado la importancia de comprender la dinámica de las enfermedades infecciosas en los sistemas naturales en donde se originan. Cambios en la diversidad de especies provocados por actividades humanas y por cambios estacionales naturales, representan un contexto ideal para entender esta relación. Frecuentemente, la extinción local y los cambios en la distribución de especies favorecen o limitan la dispersión, transmisión y mantenimiento de sus patógenos a través del tiempo y espacio. Incluso, infecciones producidas por un mismo patógeno se mantienen en grupos de vertebrados alejados filogenéticamente, por ejemplo, aves y mamíferos comparten patógenos multihospedero como bacterias, hongos, protozoarios y virus. En este estudio se investigó la posibilidad de que especies del género flavivirus, hospedadas por las aves migratorias de Norteamérica establecieran sus ciclos selváticos en comunidades de múltiples hospederos (aves y roedores) en Bahía Kino, Sonora, que es un ecosistema típico de los humedales de la costa del Golfo de California.

Para comprender la relación entre los ensambles de especies de aves y roedores, y el mantenimiento de flavivirus, el presente trabajo se estructuró en dos capítulos. El primer capítulo se enfocó en (1) describir la estructura de la metacomunidad de aves silvestres y de roedores con base en su co-ocurrencia y distribución; y (2) evaluar el potencial de transmisión de Virus del Oeste del Nilo (WNV) en la metacomunidad. El segundo capítulo se enfocó en investigar la prevalencia

molecular de flavivirus en las comunidades de aves migratorias y residentes para evaluar si las aves migratorias de Norteamérica introducen y dispersan flavivirus en los sitios de hibernación de las aves de Bahía Kino. En el primer capítulo se argumentó que la estructura y co-ocurrencia de las comunidades de aves y roedores constituyen un escenario favorable para la transmisión y mantenimiento de WNV entre hospederos vertebrados. En el segundo capítulo se demostró que la prevalencia de flavivirus en Bahía Kino es muy baja, al grado de ser indetectable a las técnicas más sensibles. Se procesaron 701 muestras pertenecientes a 51 especies de aves, y se utilizaron protocolos de detección molecular altamente específicos. Por lo tanto, bajo esta escala de estudio y con este tamaño de muestra podemos afirmar que los resultados fueron verdaderos negativos y proponer que a) la ecología de los vectores podría asociarse a la baja prevalencia de flavivirus en la zona de estudio y, b) las aves llegan sanas o con prevalencias muy bajas que no sean suficientes para generar infecciones secundarias. En general se demostró que el estudio de la distribución de diferentes hospederos a través de comunidades dinámicas es útil para evaluar la distribución potencial de sus patógenos en tiempo y espacio. Esta aproximación ecológica de estudio es aplicable a otras enfermedades infecciosas que afectan la salud de los animales silvestres y domésticos y potencialmente la salud humana.

Abstract

In recent years, it has been observed that most zoonotic infectious diseases emerge from sites that harbor high species diversity. At the same time, it has been proposed that high species diversity can decrease the transmission of pathogens between hosts, for example, by regulating the abundance of a reservoir host. This relationship between the emergence of zoonotic pathogens and wildlife diversity has been widely studied and has highlighted the importance of understanding infectious disease dynamics in natural systems. Changes in species diversity due to human activities and to seasonal natural changes, represent an ideal context for understanding this relationship. Frequently, the changes in patterns of species assemblages can facilitate or impede the dispersion, transmission and maintenance of pathogens across space and time. Moreover, the same infectious agents can be maintained in phylogenetically distant species, for example in birds and mammals that share multi-host pathogens such as bacteria, fungi, protozoa and viruses. In this study, we assessed the possibility for the introduction and maintenance of sylvatic cycles of flaviviruses by North American migratory birds into multi-host communities of birds and rodents at Bahía Kino, Sonora-México. To better understand the association between host community assemblages and flavivirus maintenance, this study was structured in two chapters. In the first chapter, we focused on 1) describing the metacommunity structure of both birds and rodents through analysis of co-occurrence and species distributions, and 2) evaluating the potential transmission of West Nile virus (WNV) in the metacommunity of birds and rodents. In the second chapter, we focused on investigating molecular prevalence of flaviviruses in migratory and resident communities of birds in order to investigate the possibility for flavivirus introduction and dispersal by migratory birds into overwintering sites at Bahía Kino. Our results suggest that the structure and co-occurrence of communities of birds and rodents represent an ecological scenario

in which WNV could be potentially maintained between vertebrate hosts. In the second chapter, we were not able to detect flavivirus molecular prevalence even while testing 701 samples belonging to 51 species of birds with the use of highly sensitive and specific diagnostic assays. Therefore, at this spatial and temporal scale we can assure our results are true negatives and we suggest that a) vector ecology could be associated to the low prevalence of flavivirus in the study region and, b) migratory birds might not arrive infected or with very low prevalence of infection that is not sufficient for generating secondary infections. Overall, we demonstrated that the study of the distribution of different hosts through dynamic communities is useful for evaluating the potential distributions of their pathogens in space and time. This ecological approach can be applied to the study of other infectious diseases that affect wild and domestic health, and ultimately human health.

Antecedentes

Las enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes (EIE) se definen como enfermedades que han aumentado recientemente su prevalencia, cambiado su distribución geográfica y facilitado el salto taxonómico de patógenos hacia nuevos hospederos (Ostfeld and Keesing 2017). Más del 70% de las EIE son zoonosis originadas en animales silvestres y se transmiten ya sea por contacto directo, por vectores artrópodos o mediante animales domésticos (Jones et al. 2008). Durante las últimas dos décadas se han reconocido los impactos que las EIE pueden tener sobre la salud humana y animal, y sobre la economía global (Ostfeld and Keesing 2017). Por ejemplo, la reciente expansión de virus de Zika a partir de África hacia el sureste asiático, Sudamérica y Centroamérica ha producido aproximadamente 1.5 millones de casos de enfermedad en el humano y se ha declarado como una emergencia de salud pública a nivel internacional (Boeuf et al. 2016). Igualmente, otras enfermedades arbovirales emergentes y re-emergentes como Dengue y Chikungunya, y las pandemias asociadas a virus de Influenza, entre otras, han impactado la salud humana y la producción animal (Mayer, Tesh, and Vasilakis 2017; Wiethoelter et al. 2015).

Para mitigar dichos impactos producidos en salud, los patrones y procesos que rigen la emergencia de las EIE se han investigado desde perspectivas sociales, ambientales y ecológicas. Las aproximaciones ecológicas han sido ampliamente utilizadas para comprender el riesgo de emergencia de EIEs (Johnson, de Roode, and Fenton 2015). Por ejemplo, se ha propuesto que los cambios en

diversidad (riqueza/abundancia), composición y estructura de las comunidades de especies hospederas pueden modificar la transmisión de agentes infecciosos (Keesing, Holt, and Ostfeld 2006). Un aumento en la diversidad puede producir un ‘efecto de dilución’ disminuyendo la transmisión de agentes infecciosos cuando una comunidad está compuesta por una alta diversidad de especies hospederas que varían en su susceptibilidad y capacidad de transmitir un patógeno (Keesing, Holt, and Ostfeld 2006; Roche et al. 2013). Sin embargo, cuando un aumento en la riqueza de especies produce un aumento en la abundancia de hospederos que son altamente competentes para infectarse y transmitir a un agente podrá ocurrir un efecto contrario (‘efecto de amplificación’) en donde se verá favorecida la transmisión y consecuentemente aumentará la prevalencia de infección (Keesing, Holt, and Ostfeld 2006). Un ejemplo interesante en el que se ha logrado demostrar el efecto de la diversidad sobre la prevalencia de un agente infeccioso lo constituye la enfermedad de Lyme causada por la bacteria *Borrelia burgdorferi*. Diversos estudios han demostrado que la fragmentación de los bosques de Norte América incrementa las tasas de abundancia de los roedores hospederos de *B. burgdorferi* y las tasas de infección de sus vectores (*Ixodes scapularis*) (LoGiudice et al. 2003). Así mismo, se ha observado que la prevalencia de *B. Burgdorferi* sobre *I. scapularis* es menor en hábitats conservados que poseen una alta diversidad de vertebrados, en comparación con hábitats perturbados en los que se ve favorecida la abundancia de especies hospederas generalistas (Jones et al. 2013). Este ejemplo demuestra que el cambio en la abundancia de especies clave se traduce en un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad de Lyme a los humanos (Ostfeld 2009).

Algunos autores han propuesto que más allá de la diversidad *per se*, otras características ecológicas como las preferencias alimenticias de los vectores y la identidad de las especies que componen a las comunidades de hospederos vertebrados e invertebrados influyen sobre las

dinámicas de transmisión (Hamer et al. 2011; Salkeld, Padgett, and Jones 2013; Simpson et al. 2012). Así mismo, se ha propuesto que los efectos dilución y amplificación no son fenómenos generalizados, sino que la relación entre la biodiversidad y los agentes infecciosos varía en función del modo de transmisión del patógeno, del sistema de enfermedad y de la escala de estudio (Roche and Guégan 2011; Salkeld, Padgett, and Jones 2013; Wood and Lafferty 2013; Wood et al. 2014).

Estos datos resaltan la compleja realidad biológica de los sistemas naturales en donde se originan los patógenos zoonóticos y la necesidad de comprender sistemas específicos de enfermedad bajo un contexto ecológico de estudio. Por lo tanto, enfoques integrales de comunidades para estudiar enfermedades emergentes, sobre todo de aquellas ocasionadas por agentes patógenos como virus RNA que representan un reto en la salud pública y animal, son necesarios para identificar ensamblajes de especies clave y los factores asociados a la presencia y persistencia de virus y a la ocurrencia de brotes de enfermedad.

Los flavivirus y las aves silvestres

Dentro de los agentes causales de las EIEs más importantes de las últimas tres décadas se encuentran los virus RNA del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*). Los flavivirus son transmitidos por vectores artrópodos y constituyen un caso de especial interés en medicina humana y veterinaria (Farfan-Ale et al. 2010). Especies virales pertenecientes a este género (i.e. virus del Dengue DENV, virus del Oeste del Nilo WNV, virus de Usutu USUV, virus Zika ZIKV, virus de la encefalitis japonesa JEV, etc.) han demostrado un gran potencial en expandir sus rangos geográficos y en producir enfermedad en animales silvestres, domésticos y humanos (Gaunt et al. 2001; Gould and Solomon 2008; N. Johnson et al. 2010; Weissenböck et al. 2010).

Después de la introducción de WNV a Norteamérica en 1999, el estudio de las asociaciones ecológicas entre aves silvestres y flavivirus cobraron gran relevancia en la comunidad científica. La distribución y dispersión de flavivirus en hospederos naturales se asoció, entre otros factores, a procesos ecológicos como la migración estacional de las aves (Solomon and Mallewa 2001). Estudios diversos demostraron que las aves migratorias pueden acarrear flavivirus y otros patógenos de interés (i.e. virus de Influenza A, Encefalitis equina del Este y del Oeste, Virus de Newcastle, Herpesvirus en patos y Avipoxvirus) (Tommy Tsan-Yuk Lama 2013; Tian et al. 2015; Verhagen et al. 2014; Weaver and K 2010). Dado que las rutas migratorias de las aves unen regiones separadas hasta por 17,000 km y existen rutas migratorias interconectadas, la transmisión potencial de patógenos entre hospederos de distintas rutas y la exposición a nuevos patógenos y vectores en los sitios de parada pueden facilitar la introducción de dichos agentes en nuevas regiones geográficas y afectar a especies residentes susceptibles a la infección (Siembieda et al. 2010; Verhagen et al. 2014) (Reed et al 2002). A pesar de la exploración de hipótesis centradas en la dinámica de infección en aves migratorias, el conocimiento generado sobre los mecanismos de dispersión y emergencia local de flavivirus por medio de movimientos migratorios de las aves ha sido controversial, y en algunos casos no ha sido comprobado (Tommy Tsan-Yuk Lama 2013; Pfeffer and Dobler 2010). Por ejemplo, Peterson (2003) propuso que las aves migratorias podían explicar la dispersión de WNV a través de Norteamérica mientras que Rappole (2006) encontró una relación más significativa entre las especies residentes y la dispersión del virus (Peterson, Vieglais, and Andreasen 2003; Rappole and Compton 2006). A la vez, otros estudios reconocieron que (1) el establecimiento y distribución de los patógenos transportados por especies migratorias dentro de las comunidades de especies residentes no es directo e inmediato, y (2) el éxito en la dispersión de patógenos mediante los movimientos migratorios depende no sólo del acarreo mecánico de los microorganismos, sino de la ecología, la ocurrencia e

interacción local y regional entre especies residentes y migratorias (hospederas y no hospederas), y de los vectores artrópodos responsables de la transmisión (Hubálek 2004; Pfeffer and Dobler 2010; Simpson et al. 2012; Verhagen et al. 2014). Distintas especies poseen capacidades diferentes para mantener y transmitir patógenos (Joseph et al. 2013; Komar et al. 2003). Por lo anterior, la distribución de especies competentes y no competentes para transmitir patógenos será un atributo ecológico clave para el mantenimiento de los agentes en nuevas regiones geográficas a través del tiempo (Johnson et al. 2013)

Es importante considerar que la migración estacional de las aves produce la redistribución geográfica del 19% de las especies de aves que existen a nivel global (Somveille et al. 2013). Así mismo, representa un evento de ensamble y desensamble de las comunidades naturales que puede producir un aumento o pérdida de especies clave para la transmisión de agentes infecciosos (Ostfeld and LoGiudice 2003). Por lo tanto, es de suma importancia considerar que los cambios drásticos en la distribución y diversidad de las aves producen también cambios en la distribución de los patógenos y en sus dinámicas infecciosas.

La aproximación de las metacomunidades

La distribución de la diversidad en las comunidades biológicas, entendidas como un grupo de organismos de diferentes especies que habitan en tiempo y espacio, se rige por procesos e interacciones complejas que han sido abordados por las ciencias ecológicas mediante teorías y modelos. Distintas teorías desde la ‘Biogeografía de Islas’ (1967) hasta la ‘Teoría Neutral Unificada de Biodiversidad y Biogeografía’ (2001) afirmaron que las comunidades no se encuentran aisladas en la naturaleza, sino que ensambles locales de especies se encuentran influenciados por procesos

ecológicos que ocurren a escalas regionales (Goss-Custard 1993; Hubbell 2001). Por lo tanto, para comprender la distribución ecológica de las especies silvestres a una escala local, se requiere comprender el contexto regional en el que las comunidades se encuentran (Chase 2005). Esto se denomina actualmente como ‘Ecología de Metacomunidades’ y busca comprender la variación en la distribución de especies en comunidades interconectadas a distintas escalas espaciales y temporales a través de la evaluación de los mecanismos que contribuyen a estructurar la biodiversidad (Mihaljevic 2012; Mihaljevic, Joseph, and Johnson 2015; Presley, Higgins, and Willig 2010).

En la actualidad, se ha reconocido la utilidad de aplicar una aproximación de metacomunidades al estudio de las enfermedades infecciosas originadas en especies silvestres (Borer, Laine, and Seabloom 2016; Mihaljevic 2012; Suzán et al. 2015). Al estudiar las estructuras o patrones más comunes de distribución de especies en la naturaleza (i.e. la estructura de la metacomunidad) es posible identificar la forma en la que se distribuyen y co-ocurren hospederos, no hospederos y patógenos en las comunidades (Mihaljevic 2012; Mihaljevic, Joseph, and Johnson 2015; Presley, Higgins, and Willig 2010). Así mismo, es una aproximación que permite (1) caracterizar la distribución de especies aptas y no aptas para la transmisión, y (2) realizar inferencias sobre la distribución y prevalencia de patógenos de interés (i.e. flavivirus) (Mihaljevic 2012; Suzán et al. 2015).

Los sitios de hibernación de las aves migratorias en México representan un sitio dinámico ideal para estudiar si los cambios drásticos en la diversidad y en la estructura de las metacomunidades naturales de especies hospederas y no hospederas tienen efectos sobre el mantenimiento y prevalencia de patógenos.

El área de estudio fue la localidad de Bahía Kino, ubicada en el desierto de Sonora, México. Esta localidad se encuentra en una región de importancia para la conservación de las aves en México y forma parte de la ruta migratoria del Pacífico. Cada año se registra la llegada de miles de aves migratorias que provienen de Norteamérica que utilizan la localidad como sitio de parada o hibernación. A su vez la región alberga vectores competentes a flavivirus (i.e. *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis*) (Pfeiler et al. 2013), especies de aves susceptibles a la infección (Tolsá 2014) y reportes de seroprevalencia en aves, equinos y humanos en el estado de Sonora (Deardorff et al. 2006; Elizondo-Quiroga et al. 2005; Fernandez-Salas and Garza Rodriguez 2007). Bahía Kino también alberga una alta diversidad de especies de roedores silvestres que pueden ser susceptibles a la infección por flavivirus. Por lo tanto, es posible que los roedores participen en los ciclos de transmisión y por ende se consideraron como hospederos potenciales en el mantenimiento de flavivirus en la región (Han et al. 2015; Jeffrey Root 2013). Geográficamente el estado de Sonora colinda con los estados de Arizona y California en Estados Unidos (E.U.) donde se ha reportado la circulación de WNV y SLEV en especies migratorias de aves silvestres (Auguste, Pybus, and Carrington 2009; DiMenna et al. 2006; Reisen et al. 2010; White et al. 2016). Por esta razón es necesario evaluar si las comunidades de hospederos vertebrados (aves y roedores) de Bahía Kino son aptas para mantener los ciclos de transmisión de patógenos multi-hospedero como los flavivirus, que pueden ser potencialmente introducidos por especies de aves silvestres durante la migración.

Objetivos

General

Investigar la estructura de la metacomunidad de aves y roedores y la prevalencia molecular de flavivirus en las comunidades de aves de Bahía Kino, Sonora, durante la migración.

Específicos

En el Capítulo 1 se investigó (a) la estructura de las metacomunidades de aves silvestres y de roedores en Bahía Kino durante la migración y (b) la implicación que la distribución y co-ocurrencia de especies de aves competentes y roedores puede tener en la dispersión y mantenimiento de WNV en la región.

En el capítulo 2 se investigó a la prevalencia molecular de flavivirus en las comunidades de aves migratorias y residentes de Bahía Kino. Con esto, se buscó evaluar si las aves migratorias de Norteamérica introducen y dispersan flavivirus a los sitios de hibernación en Bahía Kino, y corroborar las inferencias ecológicas realizadas en el primer capítulo respecto al potencial de transmisión de WNV.

Revisión de literatura

1. Los flavivirus

Los flavivirus infectan a una amplia diversidad de especies de vertebrados e invertebrados entre las que se encuentran aves, roedores, primates, murciélagos, mosquitos y garrapatas (Gould and Solomon 2008). En general, se distribuyen en todos los continentes excepto Antártica (Weissenbock et al. 2010). Sin embargo, algunos flavivirus infectan hospederos y vectores específicos (i.e. virus de la fiebre amarilla YFV) y tienen una distribución limitada a regiones endémicas (i.e. virus de Murray Valley MVEV)(Villordo et al. 2016). Otros se han clasificado como patógenos multi-hospedero y poseen una amplia distribución mundial (p.ej. WNV) (Paz 2015). Representan algunos de los ejemplos más importantes de enfermedades infecciosas emergentes en el mundo, teniendo implicaciones importantes en la salud pública y animal. Diversos estudios han sugerido que las diferencias que poseen en epidemiología y distribución están explicadas por la ecología de sus hospederos y vectores (Gaunt et al. 2001; Gould and Solomon 2008). Así mismo, los flavivirus poseen diferencias importantes en cuanto a patogenicidad. Algunas especies como DENV y YFV han producido altas tasas de mortalidad en seres humanos a nivel mundial (Mackenzie, Gubler, and Petersen 2004). Otras especies son zoonóticas y han producido enfermedad y mortalidad tanto en animales domésticos y silvestres como en seres humanos (i.e. JEV, WNV, USUV y virus de Louping Ill LIV) (Gilbert et al. 2000; Marriott et al. 2006; Savini et al. 2011; Weissenbock et al. 2002).

Los flavivirus poseen un genoma RNA de cadena simple que codifica tres proteínas estructurales (cápside, pre-membrana y envoltura) y cinco proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Suthar, Diamond, and Gale Jr 2013). Han evolucionado de acuerdo a sus hospederos vertebrados e invertebrados (Gaunt et al. 2001). Por lo anterior se han clasificado ecológicamente en cuatro grupos con base en el vector que los transmite: El grupo (1) flavivirus transmitidos por mosquitos (MBFV); (2) flavivirus transmitidos por garrapatas (TBFV); (3) flavivirus específicos de insectos (ISFV) y (4) flavivirus sin vector reconocido (NKFV) (Villordo et al. 2016).

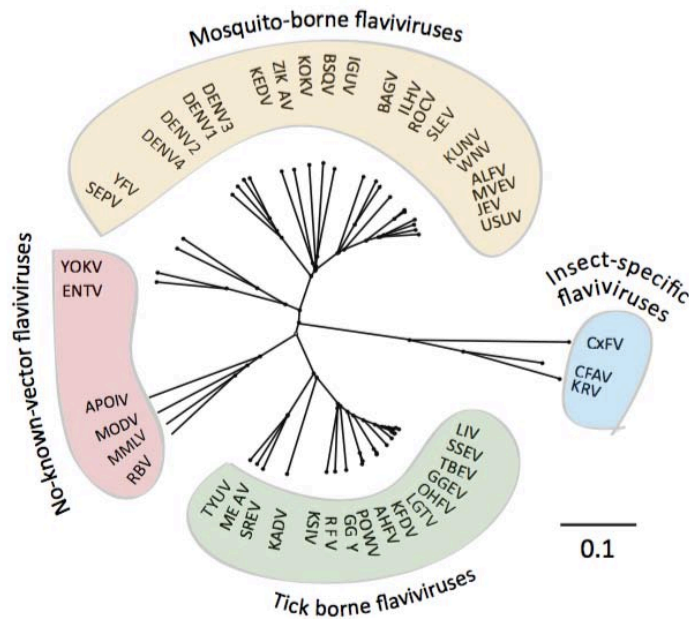


Figura 1. Clasificación ecológica de los cuatro grupos de flavivirus con base en el vector que los transmite. Tomado de Villordo et al. 2016.

En la actualidad el estudio del grupo 1 MBFV se ha considerado de alto interés dado que incluye a) virus transmitidos por mosquitos del clado *Culex* (VON, SLEV, JEV) que afectan la salud y conservación de especies de aves silvestres y tienen un gran potencial zoonótico y b) virus transmitidos por mosquitos del clado *Aedes* (YFV, DENV y ZIKV) que recientemente han expandido sus nichos ecológicos, aumentado sus incidencias en seres humanos y ocasionando un estado de alerta a nivel global (Mayer, Tesh, and Vasilakis 2017).

En el presente trabajo nos enfocaremos en especies virales del clado *Culex*, particularmente en los flavivirus WNV y SLEV. SLEV por su endemismo en América y WNV por su reciente expansión (WNV) en Norteamérica y por la asociación e impacto que ha tenido en comunidades de aves silvestres (Kilpatrick, LaDeau, and Marra 2007; Solomon and Mallewa 2001). Algunos flavivirus aislados de este clado se han encontrado asociados al complejo ‘*Culex pipiens*’ (Farajollahi et al. 2011). Este complejo incluye especies de mosquitos como: *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex australicus* y *Culex globocoxitus* (Farajollahi et al. 2011). Se ha sugerido que especies de mosquitos (i.e. *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*) pertenecientes a este complejo y otros (*Culex tarsalis*) son vectores competentes para transmitir flavivirus y poseen hábitos alimenticios generalistas (Molaei et al. 2010). Por lo anterior, además de mantener los ciclos enzoóticos ave-mosquito actúan como vectores puente para la transmisión a seres humanos y a otros mamíferos (A. Kilpatrick 2005). *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* presentan altas abundancias en ambientes urbanos (Farajollahi et al. 2011). *Culex tarsalis* presenta altas abundancias en áreas rurales de Norteamérica (Venkatesan and Rasgon 2010). De esta manera han contribuido al mantenimiento de los ciclos selváticos y a la transmisión de flavivirus zoonóticos en zonas urbanizadas de E.U. (Farajollahi et al. 2011).

El estudio de las asociaciones específicas entre ciertas especies de mosquitos y la transmisión de flavivirus es de especial interés para poder comprender su dispersión y distribución (Gaunt et al. 2001). Tanto la capacidad de los hospederos vertebrados para mantener a los virus como el comportamiento, hábitos alimenticios e interacciones locales de los vectores son factores fundamentales que determinan la posibilidad de transmisión y aparición de brotes en animales y en seres humanos (A. M. Kilpatrick et al. 2006; Simpson et al. 2012).

1.1 Virus del Oeste del Nilo

El virus del Oeste del Nilo es un flavivirus neurotrópico, endémico de África y aislado por primera vez de un paciente febril en Uganda en 1937 (Smithburn et al 1940). En el año de 1999 fue detectado por primera vez en el continente americano en la ciudad de Nueva York (Kilpatrick, LaDeau, and Marra 2007). A partir de esa introducción el virus se propagó en el resto de E.U., Canadá, México, Centro y Sudamérica (Cruz-Pacheco, Esteva, and Vargas 2012; Dupuis, Marra, and Kramer 2003; Estrada-Franco et al. 2003; Farfán-Ale et al. 2006; Komar and Clark 2006) Morales et al. 2006; Bosch et al. 2007. En E.U. ha ocasionado casi 44 mil casos de enfermedad en humanos y 2 mil muertes reportadas (CDC 2015). Actualmente el WNV es considerado el flavivirus con mayor distribución mundial (Crowder et al. 2013; Ciota and Kramer 2013; May et al. 2011; Paz 2015). El virus se mantiene en ciclos selváticos entre aves silvestres y mosquitos del género *Culex spp.*, principalmente (Laura D Kramer, Styer, and Ebel 2008). Existen 2 linajes reportados de WNV: el linaje 1 se distribuye en Norteamérica, Europa, África, Asia y Australia; y el linaje 2 se ha aislado únicamente en África y Madagascar (Hayes et al. 2005). El virus se ha reportado en 284 especies de aves y 62 especies de mosquitos (Ciota and Kramer 2013; Kilpatrick, LaDeau, and Marra 2007). Sin embargo, estos reportes no implican que todas las especies sean importantes en el ciclo de transmisión.

En general, se ha observado que en comunidades de hospederos naturales las prevalencias varían de acuerdo a factores ecológicos y a factores intrínsecos de las especies que actúan como los principales reservorios (Cruz-Pacheco, Esteva, and Vargas 2012). Por ejemplo, estudios experimentales como el de Komar Y COLABORADORES (2003) han demostrado que especies de aves silvestres varían en susceptibilidad y en capacidad para amplificar y transmitir el WNV al ser infectados (Komar et al. 2003). Estos datos sugirieron que ciertos hospederos vertebrados (aves *Passeriformes* y *Charadriiformes* de las familias *Corvidae*, *Icteridae*, *Fringillidae*, *Passeridae* y *Laridae*) pueden cumplir un papel de mayor importancia en la transmisión y se denominaron ‘hospederos competentes’ (Kilpatrick, LaDeau, and Marra 2007). Además de la competencia de los hospederos, el contacto entre hospederos y vectores y la competencia de los vectores para transmitir el virus son considerados factores determinantes para la transmisión de WNV (Ciota and Kramer 2013; Cruz-Pacheco, Esteva, and Vargas 2012). Los principales vectores competentes asociados a la transmisión de WNV en Norteamérica son *Culex pipiens*, *Culex restuans*, *Culex quinquefasciatus* y *Culex tarsalis* (Venkatesan and Rasgon 2010). *Culex pipiens* y *Culex restuans* se consideran responsables de la mayoría de la transmisión de WNV en el Noreste y Centro de E.U. (A. Kilpatrick 2005; Kilpatrick, LaDeau, and Marra 2007). *Culex quinquefasciatus* se asocia a la dispersión del WNV a través del sur de E.U. y *Culex tarsalis* a través del Oeste de E.U. (Molaei et al. 2007, 2010)(Pesko & Mores 2009).

Pese a que los hospederos amplificadores más eficaces son las aves silvestres, estudios experimentales y empíricos sugieren que algunas especies de mamíferos como ratones, ardillas y liebres pueden amplificar el WNV y fungir como hospederos alternativos en comunidades naturales (Bosco-Lauth et al. 2014; Bowen and Nemeth 2007; Gomez et al. 2008; Root et al. 2005; Jeffrey Root 2013; Tiawsirisup et al. 2005, 2010). Se ha sugerido que los hábitos alimenticios generalistas

de los vectores pueden promover la circulación del WNV en los hospederos mamíferos, sin embargo, aún se requiere evaluar la importancia del papel que pueden desempeñar en las dinámicas virales de transmisión dentro de los ciclos selváticos (Platt et al. 2007; Jeffrey Root 2013).

En México, la primera evidencia serológica de la circulación de WNV se observó en caballos en los estados de Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán en el año 2002 (Blitvich et al. 2004; Estrada-Franco et al. 2003; Loroño-Pino et al. 2003). A la vez, en el estado de Tabasco en el año 2003 se realizó el primer aislamiento del WNV a partir de un cuervo común (*Corvus corax*) que murió en el parque nacional 'El Yumka' (Estrada-Franco et al. 2003). Durante ese mismo año la circulación de WNV en aves migratorias y residentes se confirmó por primera vez en los estados de Tamaulipas y Yucatán (Farfán-Ale et al. 2004; Fernández-Salas et al. 2003). Para el año 2004 se reportó el primer aislamiento en humanos, en una mujer en el estado de Sonora y en mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) en el estado de Nuevo León (Elizondo-Quiroga et al. 2005). Otros reportes en seres humanos se realizaron en el norte del país en los estados de Chihuahua (n = 4), Nuevo León (n = 1) y Sonora (n = 1) (Blitvich 2008; Deardorff et al. 2006; Komar and Clark 2006). Adicionalmente para el año 2006 estudios de monitoreo reportaron la circulación de anticuerpos contra WNV en mamíferos y reptiles asintomáticos en la península de Yucatán, en equinos en los estados de Chiapas y Puebla y en mosquitos (*Culex nigripalpus* y *Culex interrogator*) en el estado de Chiapas (Alonso-Padilla et al. 2009; Farfán-Ale et al. 2006; Ulloa et al. 2009). En la costa del pacífico en el estado de Guerrero también se ha reportado la circulación de anticuerpos contra WNV en caballos y aves residentes (Cortés-Guzmán et al. 2013). En el año 2016 se confirmó la circulación de ARN viral en aves residentes del estado de Yucatán, sugiriendo que la circulación local del virus se ha mantenido en el sur de México a través del tiempo (Chaves et al. 2016). A pesar de que el virus no ha producido los impactos en salud humana y animal que

se observan en E.U., ha producido mortalidad en caballos y en un ser humano en el estado de Nuevo León (Blitvich et al. 2004; Rios-Ibarra et al. 2010).

1.1 Virus de la Encefalitis de San Luis

El virus de la encefalitis de San Luis es un flavivirus neurotrópico endémico de América, ampliamente distribuido desde Canadá hasta Argentina (Rodrigues et al. 2010). Fue aislado por primera vez durante un brote epidémico ocurrido en la ciudad de Saint Louis, Missouri, E.U. en 1933. Desde entonces ha ocasionado brotes esporádicos de enfermedad en humanos en E.U. y en el sur de Canadá (Hoyos-López et al. 2015; Kopp et al. 2013). Ha producido más de 10 mil casos de enfermedad severa y alrededor de 10 mil muertes en Norteamérica (May et al. 2008). En contraste, en Centro y Suramérica no se reportan casos de enfermedad con frecuencia (Auguste, Pybus, and Carrington 2009). El primer brote registrado fuera de Norteamérica se registró en la provincia de Córdoba, Argentina en el año 2005, donde produjo 9 casos severos de encefalitis de casi 50 casos confirmados (Diaz et al. 2006). Estudios filogenéticos han demostrado la existencia de 8 linajes de SLEV: los linajes I y II circulan principalmente en Norteamérica y los linajes III a VIII circulan principalmente en centro y Sudamérica (Kopp et al. 2013). Al igual que WNV, los ciclos selváticos involucran aves silvestres de los órdenes Passeriformes y Columbiformes, principalmente, y mosquitos del género *Culex spp.* Sin embargo, en el Neotrópico algunos mamíferos como murciélagos, roedores y marsupiales se han reportado infectados con SLEV (Hoyos-López et al. 2015; Rodrigues et al. 2010). En sus distintas regiones de distribución, SLEV también utiliza diferentes especies de hospederos invertebrados; en la parte norte de E.U. se ha aislado principalmente de mosquitos *Culex pipiens* mientras que en el Sureste se aísla principalmente de *Culex nigripalpus*. En el Suroeste de E.U. se ha aislado principalmente de *Culex quinquefasciatus* así como de *Culex tarsalis* en áreas rurales (May et al. 2008). Especies alternativas de mosquitos como

Culex declarator y *Culex coronator* se han encontrado infectadas con el virus en Brazil (Hoyos-López et al. 2015).

A diferencia del WNV, SLEV no produce enfermedad ni signos clínicos en sus hospederos silvestres (Weissenbock et al. 2010). En México, existe evidencia serológica de su circulación en aves en el estado de Yucatán y caballos en el estado de Nuevo León (Marlenee et al. 2004; Ulloa et al. 2009). En el municipio de Palenque, Chiapas se ha detectado ARN viral de SLEV en poblaciones de mosquitos *Culex nigripalpus* (Kopp et al. 2013). Este mosquito es considerado uno de los vectores principales dentro de los ciclos selváticos de SLEV en México. Además, posee hábitos alimenticios oportunistas por lo que puede actuar como vector puente entre ciclos de amplificación selváticos y epidémicos (Kopp et al. 2013). Estudios filogenéticos han sugerido que la circulación de las variantes de SLEV entre México, centro y Sudamérica son introducidas cada año a E.U. por medio de los movimientos migratorios de las aves reservorias (Auguste, Pybus, and Carrington 2009). El brote reciente de enfermedad (2015) en humanos del estado de California provee evidencia de esta hipótesis dada la alta similitud entre secuencias virales detectadas durante el brote y las detectadas previamente en Argentina en el año 2005 (White et al. 2016). El monitoreo de SLEV en aves a través de las rutas migratorias no se realiza en México. Por lo anterior, aún no se conocen las regiones clave en nuestro país para su mantenimiento y posible dispersión.

2. Los flavivirus en comunidades de aves en México

En México se ha confirmado la presencia de WNV y SLEV en comunidades de aves silvestres y mosquitos mediante técnicas serológicas y moleculares (Chaves et al. 2016; Elizondo-Quiroga et al. 2005; Kopp et al. 2013). Se sabe que estas especies virales poseen el potencial de producir enfermedad en el humano, sin embargo, en nuestro país la falta de conocimiento sobre sus dinámicas en las

comunidades de hospederos naturales es notoria y los factores clave para su emergencia no se han logrado comprender. Por ejemplo, mientras que en E.U. el WNV ha ocasionado impactos en la conservación de poblaciones de aves susceptibles, además de enfermedad neurológica y mortalidad en seres humanos, en México no parece producir tales impactos en salud humana ni animal (Rodríguez et al. 2010). Una de las hipótesis propuestas para explicar estos escenarios radica en las diferencias de los atributos ecológicos de las comunidades de aves entre México y E.U. (i.e. composición de especies, recambio y distribución de hospederos a través de las comunidades) (Cruz-Pacheco, Esteva, and Vargas 2012). Otra de las hipótesis propone la existencia de inmunidad a WNV en seres humanos y comunidades de vertebrados gracias a la circulación y previa exposición a flavivirus endémicos de México (SLEV y DENV). Igualmente se considera que las diferencias en la presentación de los brotes pueden deberse a la falta de reportes oficiales, falta de técnicas diagnósticas disponibles y falta de vigilancia epidemiológica (Cruz-Pacheco, Esteva, and Vargas 2012; Rodríguez et al. 2010). En el caso de SLEV existen muy pocos reportes de la circulación del virus en las comunidades de aves en México y en humanos no se han reportado brotes epidémicos de enfermedad de manera oficial (White et al. 2016). Se ha propuesto que los linajes que circulan en México y Sudamérica poseen menor virulencia que las presentes en E.U. (Hoyos-López et al. 2015). Esta podría ser la razón por la que la circulación del virus es inaparente en hospederos vertebrados en México, sin embargo, el potencial de emergencia de la enfermedad es desconocido en nuestro país.

Un gran porcentaje del conocimiento de flavivirus en México gira entorno a la detección serológica de estos patógenos en poblaciones de reservorios naturales. Sin embargo, pese a que esto indica una historia de interacción entre el parásito y el hospedero, no considera la posibilidad de que el patógeno esté circulando activamente o de que pueda producir un brote de enfermedad (Rappole 2000). El estado de Sonora se encuentra dentro de una de las principales rutas migratorias de las aves

silvestres de Norteamérica (i.e. ruta migratoria del Pacífico). Especies pertenecientes a esta ruta se han reconocido como reservorios importantes de flavivirus en E.U. (Hubálek 2004). Estos datos sugieren que el monitoreo de flavivirus, así como el estudio de las comunidades de aves en el norte de México y los procesos ecológicos que gobiernan su distribución son fundamentales de considerar para atender dichas incógnitas sobre las dinámicas virales y el riesgo zoonótico en nuestro país.

CAPÍTULO 1. METACOMMUNITIES OF BIRDS AND RODENTS AND THE
POTENTIAL FOR WEST NILE VIRUS TRANSMISSION

Metacommunities of birds and rodents and the potential for West Nile virus transmission

Paulina Álvarez-Mendizábal¹, Gabriel E. García-Peña¹, Hugo Mendoza-Gutiérrez¹, María J. Tolsá-García¹, Jesús Sotomayor-Bonilla¹, Tracey Goldstein³, Gerardo Suzán^{1*}

¹ Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una salud, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México

² One Health Institute, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, Davis, California, United States of America

*corresponding author: gerardosuz@gmail.com

Abstract

Epidemiological surveillance often focuses on identifying key hosts and vectors. However, this approach does not always incorporate ecological factors in understanding the spread and circulation of pathogens. Transmission of vector-borne pathogens in multi-host systems can be facilitated if hosts co-occur in ecological settings. Thus, investigating distribution of known and potential hosts may help to better understand transmission dynamics. Here, we investigated the distribution of susceptible species and competent reservoirs for West Nile virus at Bahía Kino, Sonora-México. We used metacommunity analyses and the Chao's dissimilarity index to assess the co-occurrence between West Nile virus competent birds and susceptible rodent hosts. We found that migratory competent birds are widely distributed across the metacommunity, and significantly co-occur with resident birds and rodents during the migration season. This suggests that the West Nile virus could be potentially transmitted and maintained in the vertebrate metacommunity. Also, the study illustrates that metacommunity analyses can provide insights into understanding factors affecting viral sylvatic transmission, and helps to identify potential hosts for follow-up epidemiological surveillance to confirm the presence of infection.

Keywords: co-occurrence, West Nile virus, multi-host pathogen, metacommunity ecology

1. Introduction

Currently, epidemiological surveillance focuses on detecting species that are key in the transmission of zoonotic pathogens that impair human health [1]. While these approaches provide important insights into the infection of hosts, they may not be adequate to understand the ecological processes that influence transmission dynamics in sylvatic cycles.

One first step to investigate sylvatic cycles of zoonotic pathogens is to assess the co-occurrence of known host and potential host species [2]. This can be useful to infer potential interactions between hosts, non-hosts and vectors, and has been studied with different approaches. For example, given the degree of co-occurrence within a mammal-vector interaction network, Gonzalez-Salazar (2017) predicted a list of potential hosts for Zika virus in Mexico. The potential hosts were proposed as important food sources for vectors based on the spatial co-existence of hosts with vectors rather than only on intrinsic abilities of each host to act as reservoir [3].

Likewise, metacommunity analysis can be useful for understanding infectious disease patterns [4]. Theoretically, the distribution and local extinction of host species in the metacommunity (the set of local communities that are linked by dispersal) may favor contact between infected animals and susceptible ones, or impede the contact between them and therefore, limit the potential for transmission [5–7]. Thus, understanding species distribution and co-occurrence is one factor that may affect disease transmission and can be a first step to assess the potential for transmission of pathogens between hosts.

Here, we used metacommunity and co-occurrence analysis to investigate the potential for transmission of the West Nile Virus (WNV) (Genus: *Flavivirus*, Family: *Flaviviridae*). The virus circulates between a variety of mosquitoes and wild bird hosts [8]. Experimental evidence suggests that some bird species are competent hosts, as they can be infected, amplify the virus, and transmit

it back to vectors [9]. Likewise, experiments suggest that wild mammals may also amplify WNV [10], however their role in WNV transmission remains uncertain.

We evaluated the distribution and co-occurrence of migratory and resident birds (WNV competent hosts) and rodents (susceptible hosts) at Bahía Kino, Sonora-Mexico. Bahía Kino is ideal for examining the spread of WNV because it is an important stopover in the Pacific flyway of North American birds. It also has a great diversity and endemism of rodent species, such as the house mouse (*Mus musculus*) and the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) that have been reported to be seropositive for antibodies to WNV in natural communities [11,12]. Mosquito species in the Sonoran desert include *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis*, which are WNV vectors that feed indiscriminately on birds and mammals [13,14]. Mosquito feeding opportunities can depend on vertebrate host availability, and ultimately vertebrate host distributions may affect the distribution of pathogens [4,15]. Thus, theoretical approaches that examine vertebrate community ecology and interactions between potential hosts may help to explore transmission of WNV in complex systems [16].

2. Methods

We captured birds and rodents in three different habitats (Halophytic vegetation, Mesquite and Mangrove) at Bahía Kino, Sonora-Mexico. Each habitat represented a local community embedded within the metacommunity (Figure 1a). Birds were captured with mist nets and rodents were captured with Sherman traps during October 2015, January 2016 and September 2016. These months correspond to the autumn (October, September) and winter seasons (January) in which avian migrants arrive to the region.

Co-occurrence between birds and rodents was quantified by using the Chao's dissimilarity index in space and time on a site-by-species abundance matrix [17]. To examine space-time variation in the communities of birds and rodents, Chao's dissimilarity was assessed with data from all three habitats and months (nine scenarios), with values of zero, i.e. low dissimilarity, indicating high co-occurrence between species. Co-occurrence of WNV competent and alternative (non-competent) hosts was compared, to identify potential interactions between key species and opportunities for transmission.

Metacommunity structure was assessed by analyzing three parameters of species distribution (coherence, turnover and boundary clumping) in a site-by-species incidence matrix [18,19]. Statistical inference of these parameters was evaluated by comparing the observed incidence matrix and a random matrix (r1) [18]. Random matrices were generated with 1000 simulations using the r1 null model. This null model assumes that habitats are saturated, i.e. the habitat maintains species richness of sites and habitat heterogeneity [20].

3. Results

We captured and identified a total of 988 birds and 1362 rodents representing 74 and 13 species in 62 capture days. Thirteen bird species (17%) have been reported in the literature as competent for West Nile virus infection (Table 1.) [8,9,21].

Migratory birds comprised 56% of the species and were captured in all three habitats and seasons. The most abundant individuals were migratory competent species for WNV, and included the Orange-crowned warbler (*Oreothlypis celata* 19%) and the White-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys* 17%). These species arrived during early autumn and overwintered until January and were present in all habitat types. Resident WNV competent species included the House sparrow (*Passer domesticus* 3.5%) and the Common ground dove (*Columbina passerina* 3.6%). However,

they were not widely distributed across sites as some resident species, such as the Northern cardinal (*Cardinalis cardinalis*) and the Mexican grackle (*Quiscalus mexicanus*), were site specific. Most abundant rodents were the Merriam's kangaroo rat (*Dipodomys merriami* 29%) and the Rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius* 28.6%), and in addition to the Harris's Antelope squirrel (*Ammospermophilus harrisi*) they were also the most widespread rodent species at the metacommunity of Bahía Kino.

Chao's dissimilarity index showed a total of 73 high co-occurrences out of 1118. Of these, 23 were co-occurrences among the WNV competent birds and 50 between WNV competent birds and potential rodent hosts (Table 1). Metacommunity structure of birds and rodents exhibited a Clementsian structure, as species were clumped across sites in the metacommunity. (Figure 2) [19].

4. Discussion

Co-occurrences suggest that WNV competent bird species might have the potential to interact with each other, and with all the rodent species during both seasons (Figure 1b). The potential opportunities for transmission of WNV may be present locally in halophytic vegetation where WNV competent avian residents that are limited in distribution such as the House sparrow and the Mexican grackle co-occur, and regionally where WNV competent migrants with wider distributions (Orange-crowned warbler, White-crowned sparrow) co-occur with competent residents (Figure 2).

Some rodents such as *A. harrisi*, *C. intermedius* and *D. merriami* co-occurred significantly with almost half (46%) of the known WNV competent birds. Because WNV can use highly conserved host cell receptors that allow for entry into mammalian hosts [22], a high degree of co-occurrence between WNV competent birds and rodents in contact with mosquito vectors could potentially allow for the possibility of mammals to become infected. The ecological factors that support this idea

include: (i) the high relative abundance of co-occurring WNV competent birds; (ii) close phylogenetic relationship of squirrels (*A. harrisii* and *S. tereticaudus*) with WNV amplifying species (genus *Sciurus*) [23], and (iii) presence of rodent species with evidence of molecular and serological exposure to WNV such as *S. hispidus* [12].

Clementsian metacommunity structures are often associated with heterogeneous habitats in which some species are clustered [24]. In terms of prevalence of infection, these structures could lower the potential for transmission regionally if reservoir hosts were limited to a single site or local community. However, reservoir hosts that are distributed across communities could spread pathogens and increase the potential for transmission of infection in the metacommunity [4]. While some bird and rodent species form exclusive groups throughout the Clementsian structure of Bahía Kino, others co-occur across the same habitats at the same time. Based on these data, the metacommunity may be suitable to allow for viral transmission between birds and rodents, should contact with vectors occur and if potential rodent hosts are susceptible to infection (Figure 2).

5. Conclusion

Given the distribution, structure and co-occurrence of birds and rodents we propose a scenario in which WNV could potentially be transmitted and maintained in the vertebrate metacommunity. Identifying potential hosts such as rodent species is important given their potential role as hosts for zoonotic viruses, and the potential for some species to interact with humans [25]. Our approach highlights the use of species distribution data to explore viral transmission and to better understand the potential hosts for vector-borne virus infection. To provide further insights into the sylvatic cycles

of WNV and other mosquito-borne Flaviviruses, studies would need to include viral testing of birds, rodents and competent vectors that co-occur to confirm that infection does occur.

Acknowledgements

We acknowledge UC Mexus-CONACYT Collaborative Grant, PAPIIT Project IN221715, Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal, UNAM, and CONACYT MSc grant for PAM.

Authors' contributions

Manuscript design and data analysis PAM, GEGP. Manuscript writing PAM, GEGP, TG, HMG, JSB, MJT, GS. Data collection PAM, GEGP, JSB, MJTG, HMG, GS.

Supplementary information

Data supporting analysis was uploaded as supplementary material (SM1).

Competing interests

Authors have no competing interests

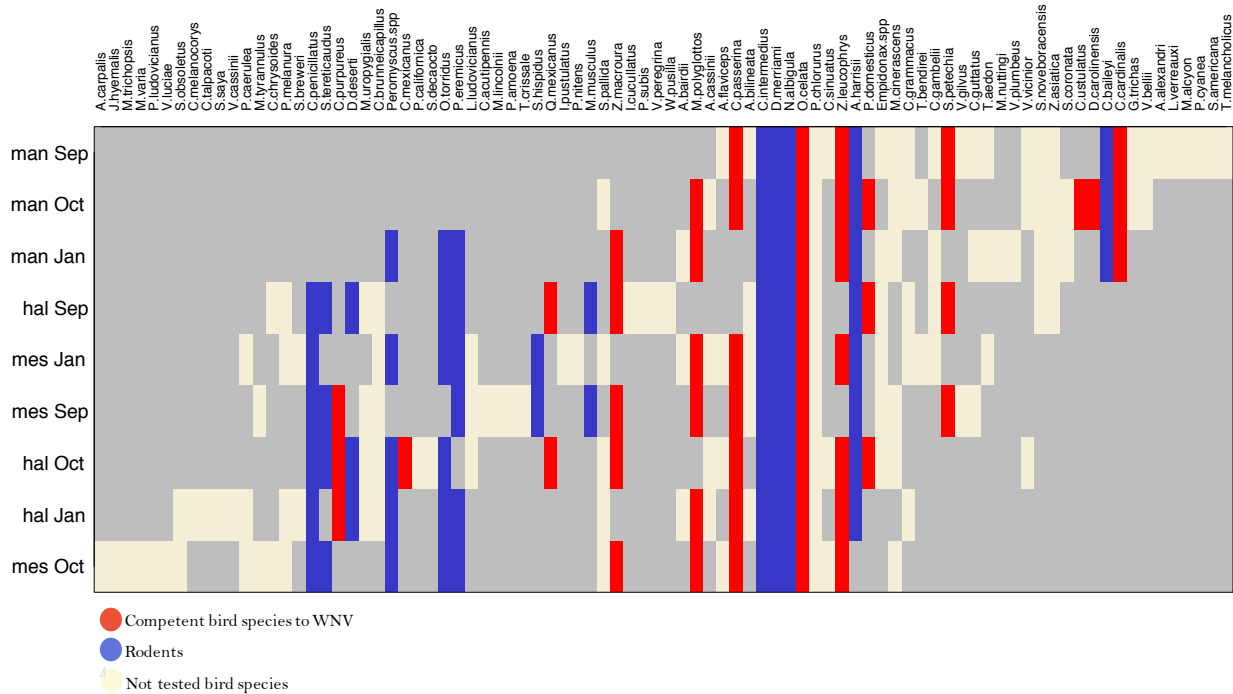


Figure 2. Metacommunity structure of birds and rodents in nine scenarios. Some WNV competent birds (in red) are widely distributed across all scenarios. Others are site specific *and* could maintain infection locally. Rodent species (in blue) are also widely distributed across scenarios, co-existing with WNV competent bird species.

hal= halophytic vegetation Oct= October- autumn

mes= mesquite Jan= January- winter

man= mangrove Sep= September- autumn

Table 1. Co-occurrence values of Chao's dissimilarity index between competent bird species and rodent species. Values of zero (in blue) indicate co-occurrences.

Competent bird species to WNV	Migratory status	Competent bird sp. 2	Chao's Index	Rodent species	Chao's Index
Cardinalis cardinalis	Resident	Zonotrichia leucophrys	0.14	Chaetodipus baileyi	0
		Setophaga petechia	0.16	Ammospermophilus harrisi	0.25
		Oreothlypis celata	0.33	Chaetodipus intermedius	0.33
		Mimus polyglottos	0.44	Dipodomys merriami	0.33
				Neotoma albigula	0.33
Carpodacus mexicanus	Resident	Quiscalus mexicanus	0.5		
Catharus ustulatus	Migratory	Dumetella carolinensis	0		
Columbina passerina	Resident	Mimus polyglottos	0	Ammospermophilus harrisi	0
		Oreothlypis celata	0	Chaetodipus intermedius	0
		Zonotrichia leucophrys	0	Chaetodipus penicillatus	0
		Zenaida macroura	0.05	Dipodomys merriami	0
		Carpodacus purpureus	0.14	Neotoma albigula	0
				Onychomys torridus	0
				Peromyscus eremicus	0
				Peromyscus spp	0
				Spermophilus tereticaudus	0.08
Setophaga petechia	Migratory	Oreothlypis celata	0	Ammospermophilus harrisi	0
		Columbina passerina	0.08	Chaetodipus intermedius	0
		Cardinalis cardinalis	0.16	Dipodomys merriami	0
		Passer domesticus	0.16	Neotoma albigula	0
		Zenaida macroura	0.35	Chaetodipus baileyi	0.16
		Mimus polyglottos	0.44	Spermophilus tereticaudus	0.22
				Mus musculus	0.25
				Chaetodipus penicillatus	0.44
		Peromyscus eremicus	0.44		
Dumetella carolinensis	Migratory	Catharus ustulatus	0		
Carpodacus purpureus	Migratory	Columbina passerina	0.14	Chaetodipus penicillatus	0
		Oreothlypis celata	0.33	Dipodomys deserti	0
		Zenaida macroura	0.33	Spermophilus tereticaudus	0.16
		Mimus polyglottos	0.44	Ammospermophilus harrisi	0.25

				Chaetodipus intermedius	0.33
				Dipodomys merriami	0.33
				Neotoma albigula	0.33
				Peromyscus spp	0.33
				Onychomys torridus	0.44
				Peromyscus eremicus	0.44
Mimus polyglottos	Resident	Columbina passerina	0	Ammospermophilus harrisi	0
		Oreothlypis celata	0	Chaetodipus intermedius	0
		Zenaida macroura	0	Chaetodipus penicillatus	0
		Zonotrichia leucophrys	0	Dipodomys merriami	0
		Cardinalis cardinalis	0.44	Neotoma albigula	0
		Carpodacus purpureus	0.44	Onychomys torridus	0
		Setophaga petechia	0.44	Peromyscus eremicus	0
				Peromyscus spp	0
				Chaetodipus baileyi	0.44
				Spermophilus tereticaudus	0.44
				Sigmodon hispidus	0.5
Passer domesticus	Resident	Quiscalus mexicanus	0	Dipodomys deserti	0
		Setophaga petechia	0.16	Spermophilus tereticaudus	0.16
		Oreothlypis celata	0.33	Ammospermophilus harrisi	0.25
		Zenaida macroura	0.33	Dipodomys merriami	0.33
				Neotoma albigula	0.33
				Chaetodipus intermedius	0.33
				Chaetodipus penicillatus	0.44
				Onychomys torridus	0.44
Quiscalus mexicanus	Resident	Passer domesticus	0	Dipodomys deserti	0
		Zenaida macroura	0.4	Spermophilus tereticaudus	0.25
		Carpodacus mexicanus	0.5	Chaetodipus intermedius	0.33
				Chaetodipus penicillatus	0.5
				Onychomys torridus	0.5
Oreothlypis celata	Migratory	Columbina passerina	0	Ammospermophilus harrisi	0
		Setophaga petechia	0	Chaetodipus intermedius	0
		Mimus polyglottos	0	Chaetodipus penicillatus	0
		Zenaida_macroura	0	Dipodomys merriami	0
		Zonotrichia_leucophrys	0	Neotoma albigula	0
		Cardinalis cardinalis	0	Onychomys torridus	0
		Carpodacus purpureus	0.33	Peromyscus eremicus	0
		Passer domesticus	0.33	Peromyscus spp	0
				Spermophilus tereticaudus	0
				Chaetodipus baileyi	0.33
				Dipodomys deserti	0.33
Zenaida macroura	Resident	Mimus polyglottos	0	Ammospermophilus harrisi	0

		Oreothlypis celata	0	Chaetodipus intermedius	0
		Columbina passerina	0.05	Dipodomys merriami	0
		Zonotrichia leucophrys	0.05	Neotoma albigula	0
		Carpodacus purpureus	0.33	Onychomys torridus	0
		Passer domesticus	0.33	Peromyscus eremicus	0
		Setophaga petechia	0.35	Peromyscus spp	0
		Quiscalus mexicanus	0.4	Spermophilus tereticaudus	0
				Dipodomys deserti	0.33
				Mus musculus	0.4
Zonotrichia leucophrys	Migratory	Columbina passerina	0	Ammospermophilus harrisi	0
		Mimus polyglottos	0	Chaetodipus intermedius	0
		Oreothlypis celata	0	Chaetodipus penicillatus	0
		Zenaida macroura	0.05	Dipodomys merriami	0
		Cardinalis cardinalis	0.14	Neotoma albigula	0
		Setophaga petechia	0.51	Onychomys torridus	0
		Carpodacus purpureus	0.52	Peromyscus eremicus	0
		Passer domesticus	0.52	Peromyscus spp	0
				Chaetodipus baileyi	0.14
				Spermophilus tereticaudus	0.51
		Dipodomys deserti	0.52		

References

1. Lloyd-Smith JO, George D, Pepin KM, Pitzer VE, Pulliam JRC, Dobson AP, Hudson PJ, Grenfell BT. 2009 Epidemic Dynamics at the Human-Animal Interface. *Science* **326**, 1362–1367. (doi:10.1126/science.1177345)
2. Johnson PTJ, Preston DL, Hoverman JT, Richgels KLD. 2013 Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature* **494**, 230–233. (doi:10.1038/nature11883)
3. González-Salazar C, Stephens CR, Sánchez-Cordero V. 2017 Predicting the Potential Role of Non-human Hosts in Zika Virus Maintenance. *EcoHealth* **14**, 171–177. (doi:10.1007/s10393-017-1206-4)
4. Suzán G *et al.* 2015 Metacommunity and phylogenetic structure determine wildlife and zoonotic infectious disease patterns in time and space. *Ecol. Evol.* **5**, 865–873. (doi:10.1002/ece3.1404)
5. Chase JM, Myers JA. 2011 Disentangling the importance of ecological niches from stochastic processes across scales. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **366**, 2351–2363. (doi:10.1098/rstb.2011.0063)
6. Garcia-Peña GE, Garchitorena A, Carolan K, Canard E, Prieur-Richard AH, Suzán G, Mills JN, Roche B, Gu??gan JF. 2016 Niche-based host extinction increases prevalence of an environmentally acquired pathogen. *Oikos* **125**, 1508–1515. (doi:10.1111/oik.02700)
7. Lacroix C, Jolles A, Seabloom EW, Power AG, Mitchell CE, Borer T. 2014 Non-random biodiversity loss underlies predictable increases in viral disease prevalence. *J. R. Society*

- Interface* **11**, 20130947–20130947.
8. Kilpatrick, LaDeau SL, Marra PPP. 2007 Ecology of West Nile virus transmission and its impact on birds in the western hemisphere. *The Auk* **124**, 1121–1136. (doi:10.1642/0004-8038(2007)124[1121:EOWNVT]2.0.CO;2)
 9. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth NM, Edwards E, Hettler DL, Davis BS, Bowen RA, Bunning ML. 2003 Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis. J.* **9**, 311. (doi:10.3201/eid0903.020628)
 10. Jeffrey Root J. 2013 West Nile virus associations in wild mammals: A synthesis. *Arch. Virol.* **158**, 735–752. (doi:10.1007/s00705-012-1516-3)
 11. Cigarroa-Toledo N, Talavera-Aguilar LG, Baak-Baak CM, García-Rejón JE, Hernandez-Betancourt S, Blitvich BJ, Machain-Williams C. 2016 Serologic Evidence of Flavivirus Infections in Peridomestic Rodents in Merida, Mexico. *J. Wildl. Dis.* **52**, 168–172. (doi:10.7589/2015-05-116)
 12. Dietrich G, Monteneri JA, Panella NA, Langevin S, Lasater SE, Klenk K, Kile JC, Komar N. 2005 Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Free-Ranging Mammals, Slidell, Louisiana, 2002. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **5**, 288–292. (doi:10.1089/vbz.2005.5.288)
 13. Kilpatrick A. 2005 West Nile Virus Risk Assessment and the Bridge Vector Paradigm. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 425–429.
 14. Pfeiler E, Flores-López CA, Mada-Vélez JG, Escalante-Verdugo J, Markow TA. 2013 Genetic diversity and population genetics of mosquitoes (Diptera: Culicidae: Culex spp.) from the Sonoran Desert of North America. *ScientificWorldJournal* **2013**, 724609–724609. (doi:10.1155/2013/724609)
 15. Lyimo IN, Ferguson HM. 2009 Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* **25**, 189–196. (doi:10.1016/j.pt.2009.01.005)
 16. Roche B, Rohani P, Dobson AP, Guégan J-F. 2013 The Impact of Community Organization on Vector-Borne Pathogens. *Am. Nat.* **181**, 1–11. (doi:10.1086/668591)
 17. Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen T-J. 2004 A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol. Lett.* **8**, 148–159. (doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00707.x)
 18. Leibold M a, Mikkelsen GM. 2002 Coherence , species turnover , and boundary clumping : elements of meta-community structure. *Oikos* **97**, 237–250. (doi:10.1034/j.1600-0706.2002.970210.x)
 19. Presley SJ, Higgins CL, Willig MR. 2010 A comprehensive framework for the evaluation of metacommunity structure. *Oikos* , 1–10. (doi:10.1111/j.1600-0706.2010.18544.x)
 20. Presley SJ, Higgins CL, López-González C, Stevens RD. 2009 Elements of metacommunity structure of Paraguayan bats: multiple gradients require analysis of multiple ordination axes. *Oecologia* **160**, 781–793. (doi:10.1007/s00442-009-1341-x)
 21. Brown CR, Brien V a O. 2011 *Are Wild Birds Important in the Transport of Arthropod-borne Viruses ?* (doi:10.1525/om.2011.71.1.1.1)
 22. Schmidt K, Keller M, Bader BL, Korytar T, Finke S, Ziegler U, Groschup MH. 2013 Integrins modulate the infection efficiency of West Nile virus into cells. *J. Gen. Virol.* **94**, 1723–1733. (doi:10.1099/vir.0.052613-0)
 23. Root JJ, Oesterle PT, Nemeth NM, Klenk K, Gould DH, Mclean RG, Clark L, Hall JS. 2006 Experimental infection of fox squirrels (*Sciurus niger*) with West Nile virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 697–701.
 24. de la Sancha NU, Higgins CL, Presley SJ, Strauss RE. 2014 Metacommunity structure in a

- highly fragmented forest: Has deforestation in the Atlantic Forest altered historic biogeographic patterns? *Divers. Distrib.* **20**, 1058–1070. (doi:10.1111/ddi.12210)
25. Han BA, Schmidt JP, Bowden SE, Drake JM. 2015 Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7039–44. (doi:10.1073/pnas.1501598112)

CAPÍTULO 2. MOLECULAR SURVEY OF MOSQUITO-BORNE FLAVIVIRUSES IN
WILD BIRDS OF THE SONORAN DESERT, MEXICO

Molecular survey of mosquito-borne flaviviruses in wild birds of the Sonoran Desert,
Mexico

Paulina Álvarez-Mendizábal¹, María J. Tolsá-García¹, Jesús Sotomayor-Bonilla¹, Hugo Mendoza-Gutiérrez¹, Concepción Pérez-Salaberría¹, Gabriel García-Peña¹, Tracey Goldstein², Susana López-Charretón³, Carlos F. Arias³, Rosa E. Sarmiento-Silva⁴, Gerardo Suzán^{1*}

¹Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una salud, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México

²One Health Institute, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, Davis, California, United States of America

³Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca-Morelos, México

⁴Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México

*corresponding author: gerardosuz@gmail.com

Abstract

Mosquito-borne flaviviruses are globally emerging pathogens and have the potential to cause diseases in human and animal populations. *Culex*-associated *flaviviruses* mainly circulate in wild bird species that may carry pathogens during their migratory movements. Therefore, wild birds have been implicated in the geographic expansion of mosquito-borne flaviviruses. Recent studies suggest that the West Nile virus (WNV) and the Saint Louis Encephalitis virus (SLEV) have entered and dispersed through Mexico as a consequence of these migration movements. However, surveillance data for viruses in adjacent areas of migratory flyways is lacking. To prove this, we evaluated the possibility of flavivirus introduction from avian migrants into resident species of birds at Bahía Kino, Sonora-México. We used viral RNA detection methods to determine flavivirus prevalence in 75 species of migratory and resident birds testing 663 cloacal swabs and 38 liver tissues. Samples were analyzed using conventional and nested PCRs for the flavivirus genus, a real-time PCR for WNV and a nested PCR for SLEV. We detected the lack of prevalence of flaviviruses in the avian communities of our study site and suggested that a) vector ecology might be associated to the low prevalence of flavivirus in the study region and, b) migratory birds might not arrive infected or with very low prevalence of infection that is not sufficient for generating secondary infections. Further investigation concerning the interplay of host with vector ecology is required for a better understanding of flavivirus circulation in this region.

Keywords: mosquito-borne flavivirus, wild bird, WNV, SLEV, migration

Introduction

Mosquito-borne flaviviruses (MBFVs) represent some of the major emerging pathogens affecting human and animal health around the world (Cumberworth et al. 2017). Some of them (i.e. Dengue DENV, West Nile WNV, Zika ZIKV, Usutu USUV and Japanese encephalitis viruses JEV) have expanded their geographical ranges invading new ecological niches in recent years (A. M. Kilpatrick and Randolph 2012). The MBFVs have been mainly found on *Culex spp.* and *Aedes spp.* mosquitoes (Gregory Moureau et al. 2015). The WNV, SLEV, and JEV from the *Culex* mosquitos have been associated to wild birds and some of them have impacted the health and conservation of avian populations (Ladeau, Kilpatrick, and Marra 2007). They have also produced febrile and neurological illnesses and outbreaks of disease in human beings (CDC 2015; Diaz et al 2015).

Migrating birds are considered important carriers of flaviviruses and arboviruses, introducing and spreading these viruses between geographical regions (Pfeffer and Dobler 2010) (Beck et al. 2013; Peterson, Vieglais, and Andreasen 2003; Malkinson 2002). During their migratory movements, wild birds are exposed to a new range of pathogens and vectors, when infected they can potentially transmit those pathogens into resident species at overwintering sites (Owen et al. 2006; Verhagen et al. 2014). However, pathogen introduction in novel communities requires the interplay of many factors that will determine if a community is capable to allow further transmission (Fuller et al. 2012). It has been demonstrated that the ecology of vertebrate hosts and vector species can determine the dynamics of infectious diseases (A. M. Kilpatrick et al. 2006). Thus, ecological attributes of natural communities should be taken into account to study potential introduction of flaviviruses into new regions (Peterson, Vieglais, and Andreasen 2003).

Migratory birds are thought to be responsible for both the introduction of WNV from the U.S. into different areas of Mexico, and for the seasonal dispersal of SLEV strains across the Americas (Blitvich et al. 2004) (Deardorff et al. 2006; Elizondo-Quiroga et al. 2005; Estrada-Franco et al. 2003) (Auguste, Pybus, and Carrington 2009; Kopp et al. 2013; White et al. 2016). Both hypotheses have been supported by the genetic similarity of WNV and SLEV isolates obtained from the U.S., Mexico and South America. Similarly, different authors have shown that competent host species traveling into México every year can present chronic infections and long periods of oral and cloacal shedding (Banet-Noach, Simanov, and Malkinson 2003; Dawson et al. 2007; Komar et al. 2002, 2003c; Nemeth et al. 2006). However, as there is an absence of continuous epidemiological surveillance in overwintering sites in the country, it remains unclear whether migratory birds are actively introducing flaviviruses each year into resident communities of birds.

In this study, we aimed to detect the molecular prevalence of flaviviruses in migratory and resident communities of birds at Bahía Kino, Sonora-Mexico. This is an endemic area for flaviviral infections as reported in avian migrants in the bordered states of Arizona and California (Molaei et al. 2010; White et al. 2016). Moreover, Bahía Kino is traversed by the Pacific migratory flyway and represents an over-wintering site where migratory and resident birds co-occur. Previous studies on bird communities at Bahía Kino suggest that species assemblages are prone to maintain flavivirus infection (Álvarez et al., *in review*), but it is important to confirm if these zoonotic viruses are circulating in key areas that could impair the health of both birds and human populations.

Methods

Netting and sample collection

As previously described, the survey took place at Bahía Kino, Sonora-Mexico (Álvarez-Mendizábal et al., 2017 *in review*). Birds were captured in three types of habitat (i.e. Halophytic vegetation, Mesquite and Mangrove) and three months using ten mist nets, opened daily from 6am to 12pm. Captures were performed for 21 days per season (i.e. for 7 days per habitat type). We collected oral and cloacal swabs and placed them in 1.5ml cryo-tubes with 200 microliters of RNA later. These were stored on coolers at 4°C during the netting hours and were subsequently frozen on liquid nitrogen at -80°C until laboratory arrival. Bird species were identified according to field guides (Sibley 2014, Howell & Webb 1995). Age and sex were identified when possible. Afterwards, individuals were ringed and all were set free in the site of collection. When individuals died during the sampling process or in the mist nets, a necropsy was performed. Liver tissue was collected in 1.5ml cryo-tubes with 200µl of RNA-later. Tissues were first stored on coolers at 4°C and then were frozen on liquid nitrogen at -80°C until laboratory arrival. All individuals were collected and sampled under the permit number FAUT-025, Folio SGPA/DGVS/01610/16, issued by SAGARPA.

RNA extractions

RNA extractions were conducted at Instituto de Biotecnología, UNAM. Total RNA was extracted manually from cloacal swabs with TRIzol Reagent. Cloacal swabs were thawed on ice and then centrifuged at 12000 rpm for 1 minute. Afterwards, 100 µl of the supernatant was transferred to an RNase-free tube where 900 µl of TRIzol Reagent were added as well. Samples were vortexed and 400 µl of chloroform were added. This was followed by a 15-minute centrifugation at 4°C and 12

000rpm. The upper aqueous phase was separated and transferred to another RNase-free tube where 500 µl of Isopropanol were added. Samples were centrifuged under the same conditions. Next, all supernatant was discarded and RNA precipitate was washed with 1ml of 75% ethanol. Samples were mixed by vortexing and then centrifuged for 7min at 4°C and 14,000 rpm. All ethanol was removed from each tube in order to dry the RNA precipitate. Next, RNA was dissolved in 25 µl of RNase-free water and was stored at -80°C until ready to use for cDNA synthesis.

RNA extractions for liver tissues were performed using Lysing Matrix D tubes. Lysing tubes were put on ice and filled with 250 µl of Trizol Reagent. Frozen liver tissues were cut and weighted (50mg) in petri dishes, and they were immediately transferred into the 2ml lysing tubes with Trizol. Lysing tubes were put in a FastPrep-24 homogenizer where liver tissues were grinded for 20 seconds. Immediately after, grinded tissues were centrifuged for 10 minutes at 4°C and 13 000rpm. Meanwhile, 1.5ml RNase-free tubes were filled with 800 µl of Trizol Reagent. The upper aqueous phase of the tissue lysates from the lysing tubes (aprox. 200 µl) were transferred into the 1.5 tubes in order to complete 1ml volume. 200 µl of Chloroform were added to each tube, they were vortexed for 15 seconds and centrifuged for 15 minutes at 4°C and 12 000rpm. The next steps replicate the methodology described above for swabs.

cDNA synthesis and PCRs

Synthesis of cDNA and PCR testing for flaviviruses was conducted at the One Health Institute Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California Davis. cDNA synthesis was performed with the Superscript III First-Strand Synthesis System and random hexamers, according to the manufacturer's instructions. For the screening of flaviviruses we used a conventional PCR according to Moureau et al. and a nested PCR according to Sanchez-Seco et al. (G Moureau et al.

2007; Sánchez-Seco et al. 2005). 1 µl of cDNA was added into each 24 µl reaction mix. In the nested PCR reaction, 1 µl of PCR product from the first round was added into the reaction mix of the second round. Both assays target a region of the flavivirus NS5 gene with a fragment size of 270bp and 141bp, respectively. Universal flavivirus positive controls were developed at the One Health Institute laboratory, UC-Davis. A WNV specific qPCR modified from Lanciotti et al was performed (Lanciotti et al. 2000). 2 µl of cDNA were added to an 18 µl reaction mix. This assay targets an 88bp fragment of the non-coding 3' region of the WNV genome. A SLEV nested PCR assay was also performed according to Kramer et al (L. D. Kramer et al. 2002). The first round yielded an 816bp product from the envelope region of SLEV. The second round yielded a 350bp product. A positive SLEV control was not available for this assay. The products of the conventional and nested PCRs were analyzed by electrophoresis on a 1.5% TAE agarose gel containing 10 µl of Gel Red.

Results

Nine hundred and eighty-eight birds representing 7 orders, 52 genera and 74 species were sampled in this survey (Table 1). From these, 663 cloacal swabs and 38 livers representing 50 and 19 species respectively, were screened for flaviviruses (Table 2). All samples tested negative for flaviviruses.

Sampling months	October 2015	January 2016	September 2016	total
Total number of individuals	399	394	194	988
Total number of species	44	38	49	74
Number of migratory species	21	19	24	42

Table 1. Number of individuals and species collected at Bahía Kino

Discussion

To our knowledge this is the first systematic study of flaviviruses in communities of birds from this region. Although we obtained negative results for flavivirus molecular presence we were able to collect a representative number of samples, and to test them with highly specific molecular assays. Our results suggest that migratory birds of the Pacific flyway do not always travel infected into Southern overwintering grounds at this temporal and spatial scale of the study. This is consistent with the findings of Reisen et al. where avian migrants returning to California from southern overwintering sites were not infected with flaviviruses (Reisen et al. 2010).

During each season, we continuously sampled passerine and columbine species which have been documented to be effective shedders of flaviviruses (i.e. *Passer domesticus*, *Carpodacus mexicanus*, *Zenaida macroura*) (Banet-Noach, Simanov, and Malkinson 2003; Dawson et al. 2007; Komar et al. 2002, 2003c; Nemeth et al. 2006). Moreover, since cloacal shedding can occur from 4 to 9 days post-infection, and viremia levels can last for up to six weeks, our sampling design would have enabled us to increase the detection probability of both migratory and resident infected individuals.

The ecological distribution and structure of the bird communities of Bahía Kino were evaluated in a previous study (Álvarez-Mendizábal et al., *in review*). Community structure showed that competent bird hosts had a widespread distribution across all local communities. Also, competent hosts were highly abundant and were present in Bahía Kino throughout the whole survey. This suggests that vertebrate host ecology would facilitate transmission dynamics if flaviviruses were

present, and thus, supports the idea that migratory birds are not introducing flaviviruses into the study region.

While the abilities of vertebrate host communities to maintain and transmit flaviviruses are major determinants for pathogen transmission, contact rates of competent mosquito vectors with the avian communities are required to support local transmission (Owen et al. 2006). In the Sonoran Desert, competent vectors such as *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* are present (Pfeiler et al. 2013). However, the exact composition and abundance of the mosquito vector communities in Bahía Kino is unknown. Because of the lack of data on vector ecology, we are not able to understand if spatio-temporal variations in mosquito vector communities can also contribute to the lack of flavivirus maintenance in this region.

Conclusions

The dispersal hypothesis of flaviviruses by migratory host species is influenced by ecological factors. It is possible that migratory birds are not arriving infected at Bahía Kino, and, if they have a very low prevalence of infection, the mosquito vector communities might not be suitable for maintaining infection cycles during the bird migration season. To better understand the complex interaction of both host and vector ecology in the introduction, transmission and maintenance of flaviviruses in novel communities, we need to further investigate the ecological attributes of the mosquito vector community contributing to virus transmission in this region.

Authors' contributions

Data collection JSB, MJTG, PAM, HMG, GS, GEGP, CPS. Manuscript writing PAM, GS, and the other authors..... Study design GS, GEGP, JSB, MJT, PAM. Molecular analysis PAM, MJTG, CPS, TG, SLC, CFA.

Acknowledgments

We acknowledge UC Mexus-CONACYT Collaborative Research Grant, PAPIIT Project IN221715, Red Mexicana de Virología, Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal, UNAM, and CONACYT MSc grant for PAM.

Table 1. Bird species tested for flaviviruses in Bahía Kino, Sonora-México

<i>Scientific name</i>	<i>Migratory status</i>	<i>Sample type</i>	<i>October 2015</i>	<i>January 2016</i>	<i>September 2016</i>	<i>Total individuals</i>
<i>Ammodramus bairdii</i>	migratory	cloacal swab	-	4	-	4
<i>Amphispiza bilineata</i>	resident	cloacal swab	-	2	9	
		liver	-	1	-	12
<i>Auriparus flaviceps</i>	resident	cloacal swab	2	1	-	
		liver	1	1	-	5
<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>	resident	cloacal swab	-	4	6	10
<i>Callipepla gambelii</i>	resident	cloacal swab	-	-	8	8
<i>Cardinalis cardinalis</i>	resident	cloacal swab	4	3	7	14
<i>Cardinalis sinuatus</i>	resident	cloacal swab	3	-	1	4
<i>Carpodacus mexicanus</i>	resident	cloacal swab	2	-	-	2
<i>Catharus guttatus</i>	migratory	cloacal swab	-	1	1	2
<i>Catharus ustulatus</i>	migratory	cloacal swab	-	-	2	2
<i>Chondestes grammacus</i>	migratory	cloacal swab	2	7	3	12
<i>Colaptes chrysoides</i>	resident	cloacal swab	1	-	1	2
<i>Columbina passerina</i>	resident	cloacal swab	22	9	4	
		liver	1	-	-	36
<i>Columbina talpacoti</i>	resident	cloacal swab	-	3	-	3

<i>Dendroica petechia</i>	migratory	cloacal swab	1	-	5	6
<i>Dumetella carolinensis</i>	migratory	cloacal swab	1	-	-	1
<i>Empidonax wrightii</i>	migratory	cloacal swab	-	-	1	
		liver	-	-	1	2
<i>Empidonax sp.</i>	migratory	cloacal swab	1	-	5	
		liver	1	-	1	8
<i>Geothlypis trichas</i>	migratory	cloacal swab	1	-	1	
		liver	1	-	-	3
<i>Haemorhous purpureus</i>	migratory	cloacal swab	1	1	1	3
<i>Icterus pustulatus</i>	resident	cloacal swab	-	1	-	1
<i>Lanius ludovicianus</i>	resident	cloacal swab	1	-	2	3
<i>Leptotila verreauxi</i>	resident	cloacal swab	-	-	1	1
<i>Melanerpes uropygialis</i>	resident	cloacal swab	1	3	6	10
<i>Mimus polyglottos</i>	resident	cloacal swab	13	6	2	21
<i>Mniotilta varia</i>	migratory	cloacal swab	1	-	-	1
<i>Myiarchus cinerascens</i>	resident	cloacal swab	9	6	3	18
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	resident	cloacal swab	3	-	1	
		liver	-	-	1	5
<i>Parkesia noveboracensis</i>	migratory	cloacal swab	5	3	12	20

Passer domesticus	resident	cloacal	27	-	1	
		swab				
		liver	2	-	-	30
Peucaea carpalis	resident*	cloacal	2	-	-	2
		swab				
Peucaea cassinii	migratory*	cloacal	1	1	-	
		swab				
		liver	-	1	-	3
Pheucticus ludovicianus	migratory	cloacal	1	-	-	1
		swab				
Pipilo chlorurus	migratory	cloacal	-	-	12	
		swab				
		liver	-	-	1	13
Polioptila melanura	resident	cloacal	-	1	-	
		swab				
		liver	-	1	-	2
Quiscalus mexicanus	resident	cloacal	2	-	2	4
		swab				
Salpinctes obsoletus	resident	cloacal	1	1	-	2
		swab				
Sayornis saya	resident	cloacal	-	1	-	1
		swab				
Setophaga coronata	migratory	liver	-	1	-	1
Spizella breweri	migratory	cloacal	-	12	-	
		swab				
		liver	-	4	-	16
Spizella pallida	migratory	cloacal	17	2	-	
		swab				
		liver	1	-	-	20
Streptopelia decaocto	resident	cloacal	2	-	-	
		swab				
		liver	1	-	-	3
Toxostoma bendirei	resident	cloacal	1	1	-	2
		swab				

Troglodytes aedon	migratory	cloacal	-	2	1	3
		swab				
Vermivora celata	migratory	cloacal	83	36	34	
		swab				
		liver	-	4	-	157
Vireo belli	migratory	cloacal	-	-	2	
		swab				
		liver	1	-	-	3
Vireo plumbeus	migratory	cloacal	1	1	-	2
		swab				
Vireo vicinior	migratory	cloacal	2	-	2	
		swab				
		liver	1	-	-	5
Zenaida asiatica	resident	cloacal	2	2	12	16
		swab				
Zenaida macroura	resident	cloacal	3	1	2	6
		swab				
Zonotrichia leucophrys	migratory	cloacal	96	82	1	
		swab				
		liver	10	1	-	190
total						701

References

- Auguste, Albert J., Oliver G. Pybus, and Christine V.F. Carrington. 2009. "Evolution and Dispersal of St. Louis Encephalitis Virus in the Americas." *Infection, Genetics and Evolution* 9 (4):709–15. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.006>.
- Banet-Noach, Caroline, Lubov Simanov, and Mertyn Malkinson. 2003. "Direct (Non-Vector) Transmission of West Nile Virus in Geese." *Avian Pathology* 32 (5):489–94. <https://doi.org/10.1080/0307945031000154080>.
- Beck, Cécile, Miguel Jimenez-Clavero, Agnès Leblond, Benoît Durand, Norbert Nowotny, Isabelle Leparç-Goffart, Stéphan Zientara, Elsa Jourdain, and Sylvie Lecollinet. 2013. "Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (11):6049–83. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049>.
- Blitvich, Bradley J., Ildefonso Fernández-Salas, Juan F. Contreras-Cordero, María A. Loroño-Pino, Nicole L. Marlenee, Francisco J. Díaz, José I. González-Rojas, et al. 2004.

- "Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo Leon State, Mexico." *Emerging Infectious Diseases* 10 (7):1314–17. <https://doi.org/10.3201/eid1007.030959>.
- Cumberworth, Stephanie L., Jordan J. Clark, Alain Kohl, and Claire L. Donald. 2017. "Inhibition of Type I Interferon Induction and Signalling by Mosquito-Borne Flaviviruses." *Cellular Microbiology* 19 (5):e12737. <https://doi.org/10.1111/cmi.12737>.
- Dawson, Jennifer R., Ward B. Stone, Gregory D. Ebel, David S. Young, David S. Galinski, Jason P. Pensabene, Mary A. Franke, Millicent Eidson, and Laura D. Kramer. 2007. "Crow Deaths Caused by West Nile Virus during Winter." *Emerging Infectious Diseases* 13 (12):1912–14. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070413>.
- Deardorff, Eleanor, José Estrada-Franco, Aaron C Brault, Roberto Navarro-Lopez, Arturo Campomanes-Cortes, Pedro Paz-Ramirez, Mario Solis-Hernandez, et al. 2006. "Introductions of West Nile Virus Strains to Mexico." *Emerging Infectious Diseases* 12 (2):314–18. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050871>.
- Elizondo-Quiroga, Darwin, C. Todd Davis, Ildefonso Fernandez-Salas, Roman Escobar-Lopez, Dolores Velasco Olmos, Lourdes Cecilia Soto Gastalum, Magaly Aviles Acosta, et al. 2005. "West Nile Virus Isolation in Human and Mosquitoes, Mexico." *Emerging Infectious Diseases* 11 (9):1449–52. <https://doi.org/10.3201/eid1109.050121>.
- Estrada-Franco, José G., Roberto Navarro-Lopez, David W.C. Beasley, Lark Coffey, Anne-Sophie Carrara, Amelia Travassos da Rosa, Tamara Clements, et al. 2003. "West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002." *Emerging Infectious Diseases* 9 (12):1604–7. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030564>.
- Fuller, Trevon, Staffan Bensch, Inge Müller, John Novembre, Javier Pérez-Tris, Robert E Ricklefs, Thomas B Smith, and Jonas Waldenström. 2012. "The Ecology of Emerging Infectious Diseases in Migratory Birds: An Assessment of the Role of Climate Change and Priorities for Future Research." *EcoHealth* 9 (1):80–88. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0750-1>.
- Kilpatrick, A Marm, Peter Daszak, Matthew J Jones, Peter P Marra, and Laura D Kramer. 2006. "Host Heterogeneity Dominates West Nile Virus Transmission," no. May:2327–33. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3575>.
- Kilpatrick, A. Marm, and Sarah E. Randolph. 2012. "Drivers, Dynamics, and Control of Emerging Vector-Borne Zoonotic Diseases." *The Lancet* 380 (9857):1946–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61151-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61151-9).
- Komar, Nicholas, Robert Lanciotti, Richard Bowen, Stanley Langevin, and Michel Bunning. 2002. "Detection of West Nile Virus in Oral and Cloacal Swabs Collected from Bird Carcasses." *Emerging Infectious Diseases* 8 (7):741–42. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020157>.
- Komar, Nicholas, Stanley Langevin, Steven Hinten, Nicole M Nemeth, Eric Edwards, Danielle L Hettler, Brent S Davis, Richard A Bowen, and Michel L Bunning. 2003. "Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus." *Emerging Infectious Disease Journal* 9 (3):311–311. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020628>.
- Kopp, A., T. R. Gillespie, D. Hobelsberger, A. Estrada, J. M. Harper, R. A. Miller, I. Eckerle, et al. 2013. "Provenance and Geographic Spread of St. Louis Encephalitis Virus." *MBio* 4 (3):e00322-13-e00322-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00322-13>.

- Kramer, L. D., T. M. Wolfe, E. N. Green, R. E. Chiles, H. Fallah, Y. Fang, and W. K. Reisen. 2002. "Detection of Encephalitis Viruses in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and Avian Tissues." *Journal of Medical Entomology* 39 (2):312–23. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.2.312>.
- Ladeau, Shannon L, A Marm Kilpatrick, and Peter P Marra. 2007. "West Nile Virus Emergence and Large-Scale Declines of North American Bird Populations." *Nature Letters*, no. Dic. <https://doi.org/10.1038/nature05829>.
- Lanciotti, R. S., A. J. Kerst, R. S. Nasci, M. S. Godsey, C. J. Mitchell, H. M. Savage, N. Komar, et al. 2000. "Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11):4066–71.
- Malkinson, Mertyn. 2002. "Introduction of West Nile Virus in the Middle East by Migrating White Storks." *Emerging Infectious Diseases* 8 (4):392–97. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010217>.
- Molaei, Goudarz, Greg A. Williams, Min-Lee Cheng, Robert F. Cummings, Philip M. Armstrong, James P. Webb, Tianyun Su, and Theodore G. Andreadis. 2010. "Vector-Host Interactions Governing Epidemiology of West Nile Virus in Southern California." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (6):1269–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0392>.
- Moureau, G, S Temmam, J P Gonzalez, R N Charrel, G Grard, and X de Lamballerie. 2007. "A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 7 (4):467–77. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0206>.
- Moureau, Gregory, Shelley Cook, Philippe Lemey, Antoine Nougairede, Naomi L. Forrester, Maxim Khasnatinov, Remi N. Charrel, Andrew E. Firth, Ernest A. Gould, and Xavier de Lamballerie. 2015. "New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences." Edited by Young-Min Lee. *PLOS ONE* 10 (2):e0117849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117849>.
- Nemeth, Nicole, Daniel Gould, Richard Bowen, and Nicholas Komar. 2006. "NATURAL AND EXPERIMENTAL WEST NILE VIRUS INFECTION IN FIVE RAPTOR SPECIES." *Journal of Wildlife Diseases* 42 (1):1–13. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.1>.
- Owen, Jennifer, Frank Moore, Nicholas Panella, Eric Edwards, Rachel Bru, Megan Hughes, and Nicholas Komar. 2006. "Migrating Birds as Dispersal Vehicles for West Nile Virus." *EcoHealth* 3 (2):79–85. <https://doi.org/10.1007/s10393-006-0025-9>.
- Peterson, A Townsend, David A Vieglais, and James K Andreasen. 2003. "Migratory Birds Modeled as Critical Transport Agents for West Nile Virus in North America." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 3 (1):27–37. <https://doi.org/10.1089/153036603765627433>.
- Pfeffer, Martin, and Gerhard Dobler. 2010. "Emergence of Zoonotic Arboviruses by Animal Trade and Migration." *Parasites & Vectors* 3 (1):35–35. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-35>.
- Pfeiler, Edward, Carlos A Flores-López, Jesús Gerardo Mada-Vélez, Juan Escalante-Verdugo, and Therese A Markow. 2013. "Genetic Diversity and Population Genetics of Mosquitoes (Diptera: Culicidae: Culex Spp.) from the Sonoran Desert of North

- America." *TheScientificWorldJournal* 2013:724609–724609.
<https://doi.org/10.1155/2013/724609>.
- Reisen, William K., Sarah S. Wheeler, Sandra Garcia, and Ying Fang. 2010. "Migratory Birds and the Dispersal of Arboviruses in California." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (4):808–15. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0200>.
- Sánchez-Seco, M.P., D. Rosario, C. Domingo, L. Hernández, K. Valdés, M.G. Guzmán, and A. Tenorio. 2005. "Generic RT-Nested-PCR for Detection of Flaviviruses Using Degenerated Primers and Internal Control Followed by Sequencing for Specific Identification." *Journal of Virological Methods* 126 (1–2):101–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.025>.
- Verhagen, Josanne H, Jacintha G B Van Dijk, Oanh Vuong, Theo Bestebroer, Pascal Lexmond, Marcel Klaassen, and Ron A M Fouchier. 2014. "Migratory Birds Reinforce Local Circulation of Avian Influenza Viruses" 9 (11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112366>.
- White, Gregory S., Kelly Symmes, Pu Sun, Ying Fang, Sandra Garcia, Cody Steiner, Kirk Smith, William K. Reisen, and Lark L. Coffey. 2016. "Reemergence of St. Louis Encephalitis Virus, California, 2015." *Emerging Infectious Diseases* 22 (12):2185–88.
<https://doi.org/10.3201/eid2212.160805>.

Discusión general

La ecología multi-hospedero de patógenos zoonóticos como los flavivirus es poco considerada dentro de la vigilancia epidemiológica en México. Pocos estudios atienden la posibilidad de transmisión inter-especie al enfocarse de manera aislada en la presencia de los virus en los principales reservorios de enfermedad. Por lo anterior en este proyecto, además de estudiar la prevalencia molecular de flavivirus en aves, se investigó la posibilidad de que un flavivirus, acarreado por las aves migratorias establezca sus ciclos selváticos en múltiples hospederos de Bahía Kino, un ecosistema representativo de los humedales del norte del país, en el Golfo de California.

En el primer capítulo se encontró que la estructura y composición de la metacomunidad de aves, asociada a la migración, potencialmente podría permitir la transmisión de WNV bajo el supuesto de que los vectores se encontraran presentes en el sitio de estudio. Especies de aves migratorias competentes para transmitir flavivirus representaron a los individuos con mayores abundancias relativas y tuvieron una amplia distribución a través de la metacomunidad. Por otro lado, la presencia de aves residentes competentes estuvo restringida a algunos tipos de hábitat. De igual forma, algunas especies de roedores potencialmente susceptibles a la infección por flavivirus exhibieron una distribución tan amplia como la de las aves competentes, mientras que otras estuvieron restringidas a algunos tipos de hábitat. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Presley [et al] en un estudio sobre la estructura de la metacomunidad de aves y roedores a través de un gradiente altitudinal, en el cual debido a la especialización por tipo hábitat de algunos grupos de especies de aves y roedores se encontraron límites en la distribución en estructuras Clementsianas (Presley et al. 2012). Esta especialización por tipo de hábitat podría reducir el potencial de dispersión de un agente infeccioso entre hospederos de la metacomunidad (Suzan et al 2015). Sin embargo, en la estructura Clementsiana

de Bahía Kino los resultados sugieren que la distribución de aves residentes competentes podría mantener la circulación de WNV de manera local durante todo el año mientras que las aves migratorias, podrían mantener los ciclos selváticos a nivel metacomunidad durante las dos estaciones muestreadas (otoño e invierno).

La red de co-ocurrencia de especies calculada a partir del índice de Chao, nos permitió evaluar en tiempo-espacio a las especies que coincidían de manera absoluta en ciertos hábitats o estaciones. Las aves competentes presentes en las comunidades de Bahía Kino co-ocurrieron entre ellas y con especies de roedores que potencialmente podrían formar parte de los ciclos selváticos de transmisión de WNV (i.e. *Ammospermophilus harrisi*). Pese a que los mamíferos no son considerados reservorios principales de WNV, estudios recientes han encontrado que diversas especies de mamíferos silvestres se infectan de forma común con flavivirus transmitidos por mosquitos del clado *Culex* (Sotomayor-Bonilla et al 2017, datos sin publicar). Esto sugiere que la especificidad alimenticia de mosquitos *Culex spp.* en hospederos de clase Aves no siempre se cumple ya que muchas especies se alimentan de manera generalista tanto de aves como de mamíferos. Por lo tanto, es necesario considerar que los flavivirus asociados a este clado podrán estar inmersos en complejos ciclos de transmisión entre las comunidades de aves y mamíferos (Sotomayor-Bonilla et al 2017, datos sin publicar). Adicionalmente, algunas de las especies de roedores identificadas en Bahía Kino (i.e. *Sigmodon hispidus*) se han encontrado infectadas con WNV en comunidades naturales (Dietrich et al. 2005). Otras representan especies filogenéticamente cercanas a ardillas del género *Sciurus spp.* (i.e. *Ammospermophilus harrisi* y *Spermophilus tereticaudus*) las cuales se han propuesto como potenciales hospederos amplificadores de WNV (Root et al. 2005).

En el capítulo 2 se evaluó la prevalencia molecular de flavivirus en las comunidades de aves residentes y migratorias de Bahía Kino. Los resultados fueron negativos para los cuatro protocolos de

detección molecular utilizados. Dado que se realizó un muestreo intensivo de 7 días seguidos por tipo de hábitat durante los 3 meses de estudio (i.e. en total 21 días de muestreo por tipo de hábitat), los resultados sugieren que las aves migratorias de Norteamérica de la ruta migratoria del Pacífico arriban sanas a las comunidades de aves de Bahía Kino. La eliminación de flavivirus por cloaca puede durar hasta 9 días post-infección y bajo infecciones crónicas los virus se detectan en órganos hasta después de 6 semanas post-infección (Komar et al. 2003) (L. D. Kramer et al. 2002; Reisen et al. 2006). Además, se utilizaron cuatro protocolos moleculares altamente sensibles a la detección de flavivirus (Moureau et al. 2007; Sánchez-Seco et al. 2005) (Lanciotti et al. 2000) (L. D. Kramer et al. 2002). El diseño de muestreo y los protocolos de detección molecular implementados fueron los adecuados para aumentar la probabilidad de detección de flavivirus en las comunidades de aves residentes y migratorias. Por lo anterior, se propone que los resultados de prevalencia molecular son verdaderos negativos y concuerdan con los resultados reportados por Reisen [et al] en California, en donde no se encontraron aves migratorias positivas a flavivirus al muestrear a individuos que regresaban a E.U. a partir de sitios de hibernación en México y Centro América por la ruta migratoria del Pacífico (Reisen et al. 2010).

Pese a que en el Capítulo I se encontraron escenarios ecológicos favorables para la transmisión potencial de flavivirus, las inferencias ecológicas realizadas sobre el mantenimiento de WNV en las comunidades de vertebrados no se pudieron comprobar. Un determinante fundamental para el mantenimiento de los ciclos selváticos y su posible detección en las comunidades naturales es la presencia y competencia de los vectores artrópodos en el sitio de estudio (Owen et al. 2006). El desierto de Sonora alberga vectores competentes y generalistas para transmitir a los flavivirus como WNV y SLEV (Pfeiler et al. 2013). Sin embargo, no se tiene conocimiento sobre la composición específica y abundancia relativa de las comunidades de mosquitos en Bahía Kino. La falta de

información sobre las comunidades de vectores no nos permite comprender si la ecología de los mosquitos puede representar un factor clave que explique la falta de mantenimiento de los ciclos selváticos de flavivirus en la región. Por lo anterior, se propone que es necesario confirmar la presencia de especies de mosquitos competentes en las comunidades de Bahía Kino, para poder evaluar con más herramientas la posibilidad del establecimiento de un ciclo selvático y de ser necesario dar continuidad al monitoreo de flavivirus en la región.

En general, las inferencias ecológicas formuladas en esta tesis respecto al posible mantenimiento de un patógeno zoonótico con base en la co-ocurrencia y distribución de hospederos reconocidos (aves) y potenciales (roedores) puede ser útil para guiar programas de monitoreo de patógenos emergentes de fauna silvestre en regiones clave y para contribuir al entendimiento de la distribución de flavivirus en México. La aproximación de metacomunidades aplicada al estudio de las dinámicas de infección de patógenos de interés, se ha utilizado en otros trabajos realizados en México; por ejemplo, se utilizó en el estudio de Rico et al (2015) en donde se evaluó la estructura de las metacomunidades virales asociadas a características funcionales de murciélagos del sureste mexicano a través de paisajes fragmentados (Rico et al 2015). Así mismo, el estudio de la co-ocurrencia de especies clave en la transmisión de patógenos zoonóticos se ha aplicado en otros trabajos realizados en México y en E.U. para comprender las dinámicas y el riesgo de infección de enfermedades vectoriales como Leishmaniasis y Zika (González et al. 2010; Constantino González-Salazar, Stephens, and Sánchez-Cordero 2017; C. González-Salazar and Stephens 2012; Stephens et al. 2009). Este estudio es el primero en utilizar una aproximación de metacomunidades, de co-ocurrencia de aves y roedores, y de detección molecular para estudiar las complejas dinámicas de transmisión de flavivirus en México. Además, el contexto ecológico de este estudio arroja información que puede ser utilizada para el establecimiento de programas de vigilancia epidemiológica de otros arbovirus en esta

y en otras regiones geográficas del país. Con base en los resultados presentados, se demostró 1) la necesidad de estudiar a las enfermedades zoonóticas infecciosas desde una aproximación ecológica y 2) que la falta de información y de conocimiento sobre la distribución natural de hospederos silvestres y vectores transmisores de patógenos es notable en México. Es fundamental que se continúen los esfuerzos de monitoreo de flavivirus y de sus hospederos y vectores en el norte del país para poder comprender los procesos que intervienen en su emergencia y mantenimiento y para la propuesta y diseño de estrategias para la protección de la salud pública y la conservación de la biodiversidad.

Referencias

- Alonso-Padilla, J., E. Loza-Rubio, E. Escribano-Romero, L. Córdoba, S. Cuevas, F. Mejía, R. Calderón, et al. 2009. “The Continuous Spread of West Nile Virus (WNV): Seroprevalence in Asymptomatic Horses.” *Epidemiology and Infection* 137 (08):1163. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002325>.
- Auguste, Albert J., Oliver G. Pybus, and Christine V.F. Carrington. 2009. “Evolution and Dispersal of St. Louis Encephalitis Virus in the Americas.” *Infection, Genetics and Evolution* 9 (4):709–15. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.006>.
- Blitvich, Bradley J. 2008. “Transmission Dynamics and Changing Epidemiology of West Nile Virus.” *Animal Health Research Reviews* 9 (01):71–86. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001430>.
- Blitvich, Bradley J., Ildelfonso Fernández-Salas, Juan F. Contreras-Cordero, María A. Loroño-Pino, Nicole L. Marlenee, Francisco J. Díaz, José I. González-Rojas, et al. 2004. “Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo Leon State, Mexico.” *Emerging Infectious Diseases* 10 (7):1314–17. <https://doi.org/10.3201/eid1007.030959>.
- Boeuf, Phillipe, Heidi E. Drummer, Jack S. Richards, Michelle J. L. Scoullar, and James G. Beeson. 2016. “The Global Threat of Zika Virus to Pregnancy: Epidemiology, Clinical Perspectives, Mechanisms, and Impact.” *BMC Medicine* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0660-0>.
- Borer, Elizabeth T., Anna-Liisa Laine, and Eric W. Seabloom. 2016. “A Multiscale Approach to Plant Disease Using the Metacommunity Concept.” *Annual Review of Phytopathology* 54 (1):397–418. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095959>.
- Bosco-Lauth, Angela, Jessica R. Harmon, R. Ryan Lash, Sonja Weiss, Stanley Langevin, Harry M. Savage, Marvin S. Godsey, et al. 2014. “West Nile Virus Isolated from a Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) in Northwestern Missouri, USA, 2012.” *Journal of Wildlife Diseases* 50 (4):976–78. <https://doi.org/10.7589/2013-11-295>.
- Bowen, Richard A., and Nicole M Nemeth. 2007. “Experimental Infections with West Nile Virus.” *Current Opinion in Infectious Diseases* 20 (3):293–97. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32816b5cad>.
- Chase, Jonathan M. 2005. “Towards a Really Unified Theory for Metacommunities.” *Functional Ecology*, 182–86.
- Chaves, Andrea, Jesus Sotomayor-Bonilla, Otto Monge, Abigaíl Ramírez, Francisco Galindo, Rosa Elena Sarmiento-Silva, Gustavo A. Gutiérrez-Espeleta, and Gerardo Suzán. 2016. “West Nile Virus in Resident Birds from Yucatan, Mexico.” *Journal of Wildlife Diseases* 52 (1):159–63. <https://doi.org/10.7589/2015-02-046>.
- Ciota, Alexander T., and Laura D. Kramer. 2013. “Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus.” *Viruses* 5 (12):3021–47. <https://doi.org/10.3390/v5123021>.
- Cortés-Guzmán, Antonio J., Rosa María Sánchez-Casas, Luis A. Ibarra-Juárez, Aldo I. Ortega-Morales, Julián E. García-Rejón, Juan F. Contreras-Cordero, Pedro Mis-Ávila, et al. 2013. “West Nile Virus Survey of Birds, Horses, and Mosquitoes of the Pacific Coast, Southern Mexico.” *Southwestern Entomologist* 38 (2):231–40. <https://doi.org/10.3958/059.038.0208>.
- Crowder, David W., Elizabeth A. Dykstra, Jo Marie Brauner, Anne Duffy, Caitlin Reed, Emily Martin, Wade Peterson, Yves Carrière, Pierre Dutilleul, and Jeb P. Owen. 2013. “West Nile Virus Prevalence across Landscapes Is Mediated by Local Effects of Agriculture on Vector and Host Communities.” Edited by Tian Wang. *PLoS ONE* 8 (1):e55006.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055006>.
- Cruz-Pacheco, Gustavo, Lourdes Esteva, and Cristobal Vargas. 2012. "Multi-Species Interactions in West Nile Virus Infection." *Journal of Biological Dynamics* 6 (2):281–98. <https://doi.org/10.1080/17513758.2011.571721>.
- Deardorff, Eleanor, José Estrada-Franco, Aaron C Brault, Roberto Navarro-Lopez, Arturo Campomanes-Cortes, Pedro Paz-Ramirez, Mario Solis-Hernandez, et al. 2006. "Introductions of West Nile Virus Strains to Mexico." *Emerging Infectious Diseases* 12 (2):314–18. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050871>.
- Diaz, Luis, Viviana Re, Walter Almiron, Adrian Farias, Ana Vazquez, Maria Paz Sanchez-Seco, Javier Aguilar, et al. 2006. "Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus Outbreak, Argentina, 2005." *Emerging Infectious Diseases* 12 (11):1752–54. <https://doi.org/10.3201/eid1211.060486>.
- Dietrich, Gabrielle, John A. Monteneri, Nicholas A. Panella, Stan Langevin, Sarah E. Lasater, Kaci Klenk, James C. Kile, and Nicholas Komar. 2005. "Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Free-Ranging Mammals, Slidell, Louisiana, 2002." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 5 (3):288–92. <https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.288>.
- DiMenna, Mark A., Rudy Bueno, Robert R. Parmenter, Douglas E. Norris, Jeff M. Sheyka, Josephine L. Molina, Elisa M. LaBeau, Elizabeth S. Hatton, and Gregory E. Glass. 2006. "Emergence of West Nile Virus in Mosquito (Diptera: Culicidae) Communities of the New Mexico Rio Grande Valley." *Journal of Medical Entomology* 43 (3):594–99. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[594:EOWNVI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[594:EOWNVI]2.0.CO;2).
- Dupuis, Alan P., Peter P. Marra, and Laura D. Kramer. 2003. "Serologic Evidence of West Nile Virus Transmission, Jamaica, West Indies." *Emerging Infectious Diseases* 9 (7):860–63. <https://doi.org/10.3201/eid0907.030249>.
- Elizondo-Quiroga, Darwin, C. Todd Davis, Ildefonso Fernandez-Salas, Roman Escobar-Lopez, Dolores Velasco Olmos, Lourdes Cecilia Soto Gastalum, Magaly Aviles Acosta, et al. 2005. "West Nile Virus Isolation in Human and Mosquitoes, Mexico." *Emerging Infectious Diseases* 11 (9):1449–52. <https://doi.org/10.3201/eid1109.050121>.
- Estrada-Franco, José G., Roberto Navarro-Lopez, David W.C. Beasley, Lark Coffey, Anne-Sophie Carrara, Amelia Travassos da Rosa, Tamara Clements, et al. 2003. "West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002." *Emerging Infectious Diseases* 9 (12):1604–7. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030564>.
- Farajollahi, Ary, Dina M. Fonseca, Laura D. Kramer, and A. Marm Kilpatrick. 2011. "'Bird Biting' Mosquitoes and Human Disease: A Review of the Role of Culex Pipiens Complex Mosquitoes in Epidemiology." *Infection, Genetics and Evolution* 11 (7):1577–85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>.
- Farfán-Ale, José A., Bradley J. Blitvich, María A. Loroño-Pino, Nicole L. Marlenee, Elsy P. Rosado-Paredes, Julián E. García-Rejón, Luis F. Flores-Flores, et al. 2004. "Longitudinal Studies of West Nile Virus Infection in Avians, Yucatán State, México." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 4 (1):3–14. <https://doi.org/10.1089/153036604773082942>.
- Farfán-Ale, José A., Bradley J. Blitvich, Nicole L. Marlenee, María A. Loroño-Pino, Fernando Puerto-Manzano, Julián E. García-Rejón, Elsy P. Rosado-Paredes, et al. 2006. "Antibodies to West Nile Virus in Asymptomatic Mammals, Birds, and Reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74 (5):908–14.
- Farfan-Ale, Jose A., Maria A. Loroño-Pino, Julian E. Garcia-Rejon, Victor Soto, Ming Lin, Molly Staley, Karin S. Dorman, Lyric C. Bartholomay, Einat Hovav, and Bradley J. Blitvich. 2010.

- “Detection of Flaviviruses and Orthobunyaviruses in Mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10 (8):777–83. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0196>.
- Fernandez-Salas, I, and M Garza Rodriguez. 2007. “Presencia Del Virus Del Oeste Del Nilo En El Noreste de Mexico.” *Salud Publica* 49 (3):85–86. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342007000300006>.
- Fernández-Salas, Ildefonso, Juan F. Contreras-Cordero, Bradley J. Blitvich, José I. González-Rojas, Amanda Cavazos-Alvarez, Nicole L. Marlenee, Armando Elizondo-Quiroga, et al. 2003. “Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Birds, Tamaulipas State, México.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 3 (4):209–13. <https://doi.org/10.1089/153036603322662192>.
- Gaunt, M, A Sall, X De Lamballerie, A Falconar, T Dzhirianian, and E Gould. 2001. “Phylogenetic Relationships of Flaviviruses Correlate with Their Epidemiology, Disease Association and Biogeography.” *J. Gen. Virol* 82:1867–76.
- Gilbert, L, L D Jones, P J Hudson, and E A Gould and H.W. Reid. 2000. “Role of Small Mammals in the Persistence of Louping Ill Virus.” *Med. Vet. Epidem.* 14:277–82.
- Gomez, Andres, A. Marm Kilpatrick, Laura D Kramer, Alan P Dupuis, Joseph G Maffei, Scott J Goetz, Peter P Marra, Peter Daszak, and A Alonso Aguirre. 2008. “Land Use and West Nile Virus Seroprevalence in Wild Mammals.” *Emerging Infectious Diseases* 14 (6):962–65. <https://doi.org/10.3201/eid1406.070352>.
- González, Camila, Ophelia Wang, Staviana E. Strutz, Constantino González-Salazar, Víctor Sánchez-Cordero, and Sahotra Sarkar. 2010. “Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species.” Edited by Alison P. Galvani. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (1):e585. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000585>.
- González-Salazar, C., and C. R. Stephens. 2012. “Constructing Ecological Networks: A Tool to Infer Risk of Transmission and Dispersal of Leishmaniasis: Constructing Ecological Networks.” *Zoonoses and Public Health* 59 (September):179–93. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01479.x>.
- González-Salazar, Constantino, Christopher R. Stephens, and Víctor Sánchez-Cordero. 2017. “Predicting the Potential Role of Non-Human Hosts in Zika Virus Maintenance.” *EcoHealth* 14 (1):171–77. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1206-4>.
- Goss-Custard, J.D. 1993. “The Effect of Migration and Scale on the Study of Bird Populations: 1991 Witherby Lecture.” *Bird Study* 3657 (January). <https://doi.org/10.1080/00063659309477133>.
- Gould, E, and T Solomon. 2008. “Pathogenic Flaviviruses.” *The Lancet* 371.
- Hamer, Gabriel L., Luis F. Chaves, Tavis K. Anderson, Uriel D. Kitron, Jeffrey D. Brawn, Marilyn O. Ruiz, Scott R. Loss, Edward D. Walker, and Tony L. Goldberg. 2011. “Fine-Scale Variation in Vector Host Use and Force of Infection Drive Localized Patterns of West Nile Virus Transmission.” Edited by Rick Edward Paul. *PLoS ONE* 6 (8):e23767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023767>.
- Han, Barbara A, John Paul Schmidt, Sarah E Bowden, and John M Drake. 2015. “Rodent Reservoirs of Future Zoonotic Diseases.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (22):7039–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501598112>.
- Hayes, Edward B., Nicholas Komar, Roger S. Nasci, Susan P. Montgomery, Daniel R. O’Leary, and Grant L. Campbell. 2005. “Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus

- Disease.” *Emerging Infectious Diseases* 11 (8):1167–73. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289a>.
- Hoyos-López, Richard, Sandra Uribe Soto, Guillermo Rúa-Urbe, and Juan Carlos Gallego-Gómez. 2015. “Molecular Identification of Saint Louis Encephalitis Virus Genotype IV in Colombia.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (6):719–25. <https://doi.org/10.1590/0074-02760280040>.
- Hubálek, Zdenek. 2004. “AN ANNOTATED CHECKLIST OF PATHOGENIC MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH MIGRATORY BIRDS.” *Journal of Wildlife Diseases* 40 (4):639–59. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.639>.
- Hubbell, S.P. 2001. *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*.
- Jeffrey Root, J. 2013. “West Nile Virus Associations in Wild Mammals: A Synthesis.” *Archives of Virology* 158 (4):735–52. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1516-3>.
- Johnson, Nicholas, Philip R Wakeley, Karen L Mansfield, Fiona McCracken, Ben Haxton, Lawrence Paul Phipps, and Anthony R Fooks. 2010. “Assessment of a Novel Real-Time Pan-Flavivirus RT-Polymerase Chain Reaction.” *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 10 (7):665–71. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0210>.
- Johnson, Pieter T J, Daniel L Preston, Jason T Hoverman, and Katherine L D Richgels. 2013. “Biodiversity Decreases Disease through Predictable Changes in Host Community Competence.” *Nature* 494 (7436):230–33. <https://doi.org/10.1038/nature11883>.
- Johnson, Jacobus C. de Roode, and Andy Fenton. 2015. “Why Infectious Disease Research Needs Community Ecology.” *Science (New York, N.Y.)* 349 (6252):1259504–1259504. <https://doi.org/10.1126/science.1259504>.
- Jones, B. A., D. Grace, R. Kock, S. Alonso, J. Rushton, M. Y. Said, D. McKeever, et al. 2013. “Zoonosis Emergence Linked to Agricultural Intensification and Environmental Change.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (21):8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>.
- Jones, Nikkita G Patel, Marc A Levy, Adam Storeygard, Deborah Balk, John L Gittleman, and Peter Daszak. 2008. “Global Trends in Emerging Infectious Diseases.” *Nature* 451 (7181):990–93. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
- Joseph, Maxwell B., Joseph R. Mihaljevic, Sarah A. Orlofske, and Sara H. Paull. 2013. “Does Life History Mediate Changing Disease Risk When Communities Disassemble?” Edited by Richard Ostfeld. *Ecology Letters* 16 (11):1405–12. <https://doi.org/10.1111/ele.12180>.
- Keesing, F., R. D. Holt, and R. S. Ostfeld. 2006. “Effects of Species Diversity on Disease Risk: Effects of Species Diversity on Disease Risk.” *Ecology Letters* 9 (4):485–98. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00885.x>.
- Kilpatrick, A. 2005. “West Nile Virus Risk Assessment and the Bridge Vector Paradigm.” *Emerging Infectious Diseases* 11 (3):425–29.
- Kilpatrick, A Marm, Peter Daszak, Matthew J Jones, Peter P Marra, and Laura D Kramer. 2006. “Host Heterogeneity Dominates West Nile Virus Transmission,” no. May:2327–33. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3575>.
- Kilpatrick, S.L. Shannon L. LaDeau, and Peter P.P. Marra. 2007. “Ecology of West Nile Virus Transmission and Its Impact on Birds in the Western Hemisphere.” *The Auk* 124 (4):1121–36. [https://doi.org/10.1642/0004-8038\(2007\)124\[1121:EOWNVT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1642/0004-8038(2007)124[1121:EOWNVT]2.0.CO;2).
- Komar, Nicholas, and Gary G. Clark. 2006. “West Nile Virus Activity in Latin America and the Caribbean.” *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health* 19 (2):112–17.

- Komar, Nicholas, Stanley Langevin, Steven Hinten, Nicole Nemeth, Eric Edwards, Danielle Hettler, Brent Davis, Richard Bowen, and Michel Bunning. 2003. "Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus" 9 (3):311–22.
- Kopp, A., T. R. Gillespie, D. Hobelsberger, A. Estrada, J. M. Harper, R. A. Miller, I. Eckerle, et al. 2013. "Provenance and Geographic Spread of St. Louis Encephalitis Virus." *MBio* 4 (3):e00322-13-e00322-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00322-13>.
- Kramer, L. D., T. M. Wolfe, E. N. Green, R. E. Chiles, H. Fallah, Y. Fang, and W. K. Reisen. 2002. "Detection of Encephalitis Viruses in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and Avian Tissues." *Journal of Medical Entomology* 39 (2):312–23. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.2.312>.
- Kramer, Laura D, Linda M Styer, and Gregory D Ebel. 2008. "A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus." *Annual Review of Entomology* 53 (1):61–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>.
- Lanciotti, R. S., A. J. Kerst, R. S. Nasci, M. S. Godsey, C. J. Mitchell, H. M. Savage, N. Komar, et al. 2000. "Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11):4066–71.
- LoGiudice, K, R Ostfeld, K Schmidt, and F Keesing. 2003. "The Ecology of Infectious Disease: Effects of Host Diversity and Community Composition on Lyme Disease Risk." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2):567–567.
- Loroño-Pino, María A., Bradley J. Blitvich, José A. Farfán-Ale, Fernando I. Puerto, José M. Blanco, Nicole L. Marlenee, Elsy P. Rosado-Paredes, et al. 2003. "Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Yucatan State, Mexico." *Emerging Infectious Diseases* 9 (7):857–59. <https://doi.org/10.3201/eid0907.030167>.
- Mackenzie, John S, Duane J Gubler, and Lyle R Petersen. 2004. "Emerging Flaviviruses: The Spread and Resurgence of Japanese Encephalitis, West Nile and Dengue Viruses." *Nature Medicine* 10 (12 Suppl):S98–109. <https://doi.org/10.1038/nm1144>.
- Marlenee, Nicole L, María A Loroño-Pino, Barry J Beaty, Bradley J Blitvich, Ildefonso Fernández Salas, Juan F Contreras Cordero, and José I González Rojas. 2004. "Detection of Antibodies to West Nile and Saint Louis Encephalitis Viruses in Horses." *Salud Pública de México* 46 (5). <https://doi.org/10.1590/S0036-36342004000500002>.
- Marriott, L, K Willoughby, F Chianini, M P Dagleish, S Scholes, a C Robinson, E a Gould, and P F Nettleton. 2006. "Detection of Louping Ill Virus in Clinical Specimens from Mammals and Birds Using TaqMan RT-PCR." *Journal of Virological Methods* 137 (1):21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.025>.
- May, F. J., C. T. Davis, R. B. Tesh, and A. D. T. Barrett. 2011. "Phylogeography of West Nile Virus: From the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas." *Journal of Virology* 85 (6):2964–74. <https://doi.org/10.1128/JVI.01963-10>.
- May, F. J., L. Li, S. Zhang, H. Guzman, D. W. C. Beasley, R. B. Tesh, S. Higgs, et al. 2008. "Genetic Variation of St. Louis Encephalitis Virus." *Journal of General Virology* 89 (8):1901–10. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000190-0>.
- Mayer, Sandra V., Robert B. Tesh, and Nikos Vasilakis. 2017. "The Emergence of Arthropod-Borne Viral Diseases: A Global Prospective on Dengue, Chikungunya and Zika Fevers." *Acta Tropica* 166 (February):155–63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>.
- Mihaljevic, Joseph R. 2012. "Linking Metacommunity Theory and Symbiont Evolutionary Ecology." *Trends in Ecology and Evolution* 27 (6):323–29. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.01.011>.

- Mihaljevic, Joseph R., Maxwell B. Joseph, and Pieter T. J. Johnson. 2015. "Using Multispecies Occupancy Models to Improve the Characterization and Understanding of Metacommunity Structure." *Ecology* 96 (7):1783–92. <https://doi.org/10.1890/14-1580.1>.
- Molaei, Goudarz, Theodore G. Andreadis, Philip M. Armstrong, Rudy Bueno, James A. Dennett, Susan V. Real, Chris Sargent, et al. 2007. "Host Feeding Pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and Its Role in Transmission of West Nile Virus in Harris County, Texas." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (1):73–81.
- Molaei, Goudarz, Greg A. Williams, Min-Lee Cheng, Robert F. Cummings, Philip M. Armstrong, James P. Webb, Tianyun Su, and Theodore G. Andreadis. 2010. "Vector-Host Interactions Governing Epidemiology of West Nile Virus in Southern California." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (6):1269–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0392>.
- Moureau, G, S Temmam, J P Gonzalez, R N Charrel, G Grard, and X de Lamballerie. 2007. "A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 7 (4):467–77. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0206>.
- Ostfeld. 2009. "Biodiversity Loss and the Rise of Zoonotic Pathogens." *Clinical Microbiology and Infection* 15 (January):40–43. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02691.x>.
- Ostfeld, and Keesing. 2017. "Is Biodiversity Bad for Your Health?" *Ecosphere* 8 (3):e01676. <https://doi.org/10.1002/ecs2.1676>.
- Ostfeld, and LoGiudice. 2003. "COMMUNITY DISASSEMBLY, BIODIVERSITY LOSS, AND THE EROSION OF AN ECOSYSTEM SERVICE." *Ecology* 84 (6):1421–27. <https://doi.org/10.1890/02-3125>.
- Owen, Jennifer, Frank Moore, Nicholas Panella, Eric Edwards, Rachel Bru, Megan Hughes, and Nicholas Komar. 2006. "Migrating Birds as Dispersal Vehicles for West Nile Virus." *EcoHealth* 3 (2):79–85. <https://doi.org/10.1007/s10393-006-0025-9>.
- Paz, S. 2015. "Climate Change Impacts on West Nile Virus Transmission in a Global Context." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1665):20130561–20130561. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0561>.
- Peterson, A Townsend, David A Vieglais, and James K Andreasen. 2003. "Migratory Birds Modeled as Critical Transport Agents for West Nile Virus in North America." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 3 (1):27–37. <https://doi.org/10.1089/153036603765627433>.
- Pfeffer, Martin, and Gerhard Dobler. 2010. "Emergence of Zoonotic Arboviruses by Animal Trade and Migration." *Parasites & Vectors* 3 (1):35–35. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-35>.
- Pfeiler, Edward, Carlos A Flores-López, Jesús Gerardo Mada-Vélez, Juan Escalante-Verdugo, and Therese A Markow. 2013. "Genetic Diversity and Population Genetics of Mosquitoes (Diptera: Culicidae: *Culex* Spp.) from the Sonoran Desert of North America." *TheScientificWorldJournal* 2013:724609–724609. <https://doi.org/10.1155/2013/724609>.
- Platt, Kenneth B., Bradley J. Tucker, Patrick G. Halbur, Sonthaya Tiawsirisup, Bradley J. Blitvich, Flor G. Fabiosa, Lyric C. Bartholomay, and Wayne A. Rowley. 2007. "West Nile Virus Viremia in Eastern Chipmunks (*Tamias striatus*) Sufficient for Infecting Different Mosquitoes." *Emerging Infectious Diseases* 13 (6):831–37. <https://doi.org/10.3201/eid1306.061008>.
- Presley, Steven J., Laura M. Cisneros, Bruce D. Patterson, and Michael R. Willig. 2012. "Vertebrate Metacommunity Structure along an Extensive Elevational Gradient in the Tropics: A

- Comparison of Bats, Rodents and Birds.” *Global Ecology and Biogeography* 21 (10):968–76. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00738.x>.
- Presley, Steven J., Christopher L. Higgins, and Michael R. Willig. 2010. “A Comprehensive Framework for the Evaluation of Metacommunity Structure.” *Oikos* 119 (6):908–17. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18544.x>.
- Rappole. 2000. “Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere.” *Emerging Infectious Diseases* 6 (4):319–28.
- Rappole, J H, and B Compton. 2006. “Modeling Movement of West Nile Virus in the Western Hemisphere.” *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 7 (5):1–10. <https://doi.org/10.1673/031.007.0501>.
- Reisen, William K., Ying Fang, Hugh D. Lothrop, Vincent M. Martinez, Jennifer Wilson, Paul Oconnor, Ryan Carney, Barbara Cahoon-Young, Marzieh Shafii, and Aaron C. Brault. 2006. “Overwintering of West Nile Virus in Southern California.” *Journal of Medical Entomology* 43 (2):344–55.
- Reisen, William K., Sarah S. Wheeler, Sandra Garcia, and Ying Fang. 2010. “Migratory Birds and the Dispersal of Arboviruses in California.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (4):808–15. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0200>.
- Rios-Ibarra, Clara, Bradley J. Blitvich, Jose Farfan-Ale, Javier Ramos-Jimenez, Sissy Muro-Escobedo, Hector R. Martínez-Rodríguez, Rocío OrtizLópez, Ernesto Torres-López, and Ana María Rivas-Estilla. 2010. “Fatal Human Case of West Nile Disease, Mexico, 2009.” *Emerging Infectious Diseases* 16 (4):741–43. <https://doi.org/10.3201/eid1604.091614>.
- Roche, Benjamin, and Jean-François Guégan. 2011. “Ecosystem Dynamics, Biological Diversity and Emerging Infectious Diseases.” *Comptes Rendus Biologies* 334 (5–6):385–92. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.02.008>.
- Roche, Benjamin, Pejman Rohani, Andy P. Dobson, and Jean-François Guégan. 2013. “The Impact of Community Organization on Vector-Borne Pathogens.” *The American Naturalist* 181 (1):1–11. <https://doi.org/10.1086/668591>.
- Rodrigues, S. G., M. R. T. Nunes, S. M. M. Casseb, A. S. C. Prazeres, D. S. G. Rodrigues, M. O. Silva, A. C. R. Cruz, J. C. Tavares-Neto, and P. F. C. Vasconcelos. 2010. “Molecular Epidemiology of Saint Louis Encephalitis Virus in the Brazilian Amazon: Genetic Divergence and Dispersal.” *Journal of General Virology* 91 (10):2420–27. <https://doi.org/10.1099/vir.0.019117-0>.
- Rodríguez, María de Lourdes Garza, Diana R. Rodríguez Rodríguez, Bradley J. Blitvich, Miguel Á. Reyes López, Ildefonso Fernández-Salas, Javier Ramos Jimenez, José A. Farfán-Ale, et al. 2010. “Serologic Surveillance for West Nile Virus and Other Flaviviruses in Febrile Patients, Encephalitic Patients, and Asymptomatic Blood Donors in Northern Mexico.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10 (2):151–57. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0203>.
- Root, J Jeffrey, Jeffrey S Hall, Robert G McLean, Nicole L Marlenee, Barry J Beaty, Justin Gansowski, and Larry Clark. 2005. “Serologic Evidence of Exposure of Wild Mammals to Flaviviruses in the Central and Eastern United States.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (5):622–30.
- Salkeld, Daniel J, Kerry A Padgett, and James Holland Jones. 2013. “A Meta-Analysis Suggesting That the Relationship between Biodiversity and Risk of Zoonotic Pathogen Transmission Is Idiosyncratic.” Edited by Kevin Lafferty. *Ecology Letters* 16 (5):679–86. <https://doi.org/10.1111/ele.12101>.
- Sánchez-Seco, M.P., D. Rosario, C. Domingo, L. Hernández, K. Valdés, M.G. Guzmán, and A.

- Tenorio. 2005. "Generic RT-Nested-PCR for Detection of Flaviviruses Using Degenerated Primers and Internal Control Followed by Sequencing for Specific Identification." *Journal of Virological Methods* 126 (1–2):101–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.025>.
- Savini, Giovanni, Federica Monaco, Calogero Terregino, Annapia Di Gennaro, Luca Bano, Chiara Pinoni, Roberta De Nardi, et al. 2011. "Usutu Virus in ITALY: An Emergence or a Silent Infection?" *Veterinary Microbiology* 151 (3–4):264–74. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.036>.
- Siembieda, Jennifer L, Christine K Johnson, Carol Cardona, and Nichole Anchell. 2010. "Influenza A Viruses in Wild Birds." *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10 (8).
- Simpson, J. E., P. J. Hurtado, J. Medlock, G. Molaei, T. G. Andreadis, A. P. Galvani, and M. A. Diuk-Wasser. 2012. "Vector Host-Feeding Preferences Drive Transmission of Multi-Host Pathogens: West Nile Virus as a Model System." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1730):925–33. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1282>.
- Solomon, T., and M. Mallewa. 2001. "Dengue and Other Emerging Flaviviruses." *Journal of Infection* 42 (2):104–15. <https://doi.org/10.1053/jinf.2001.0802>.
- Sommeille, Marius, Andrea Manica, Stuart H M Butchart, and Ana S L Rodrigues. 2013. "Mapping Global Diversity Patterns for Migratory Birds." *PLoS ONE* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070907>.
- Stephens, Christopher R., Joaquín Giménez Heau, Camila González, Carlos N. Ibarra-Cerdeña, Víctor Sánchez-Cordero, and Constantino González-Salazar. 2009. "Using Biotic Interaction Networks for Prediction in Biodiversity and Emerging Diseases." *PLoS ONE* 4 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005725>.
- Suthar, Mehul S., Michael S. Diamond, and Michael Gale Jr. 2013. "West Nile Virus Infection and Immunity." *Nature Reviews Microbiology* 11 (2):115–28. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2950>.
- Suzán, Gerardo, Gabriel E. García-Peña, Ivan Castro-Arellano, Oscar Rico, André V. Rubio, María J. Tolsá, Benjamin Roche, et al. 2015. "Metacommunity and Phylogenetic Structure Determine Wildlife and Zoonotic Infectious Disease Patterns in Time and Space." *Ecology and Evolution* 5 (4):865–73. <https://doi.org/10.1002/ece3.1404>.
- Tian, Huaiyu, Sen Zhou, Lu Dong, Thomas P Van Boeckel, Yujun Cui, Scott H Newman, John Y Takekawa, et al. 2015. "Avian Influenza H5N1 Viral and Bird Migration Networks in Asia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (1):172–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405216112>.
- Tiawsirisup, Sonthaya, Bradley J. Blitvich, Bradley J. Tucker, Patrick G. Halbur, Lyric C. Bartholomay, Wayne A. Rowley, and Kenneth B. Platt. 2010. "Susceptibility of Fox Squirrels (*Sciurus Niger*) to West Nile Virus by Oral Exposure." *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10 (2):207–9. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0158>.
- Tiawsirisup, Sonthaya, Kenneth B. Platt, Brad J. Tucker, and Wayne A. Rowley. 2005. "Eastern Cottontail Rabbits (*Sylvilagus Floridanus*) Develop West Nile Virus Viremia Sufficient for Infecting Select Mosquito Species." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 5 (4):342–50. <https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.342>.
- Tolsá, M.J. 2014. "Análisis Comparativo y Filogenético Sobre La Susceptibilidad de Las Aves a La Infección Por Virus Del Oeste Del Nilo."
- Tommy Tsan-Yuk Lama, Hon S. Ipb, Elodie Ghedinc, D. 2013. "Migratory Flyway and Geographical Distance Are Barriers to the Gene Flow of Influenza Virus among North American Birds." *Ecology Letters* 15 (1):24–33. <https://doi.org/10.1111/j.1461->

- 0248.2011.01703.x.Migratory.
- Ulloa, Armando, Heidy Hann Ferguson, José D. Méndez-Sánchez, Rogelio Danis-Lozano, Mauricio Casas-Martínez, J. Guillermo Bond, Julio C. García-Zebadúa, et al. 2009. "West Nile Virus Activity in Mosquitoes and Domestic Animals in Chiapas, México." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9 (5):555–60. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0087>.
- Venkatesan, Meera, and Jason L. Rasgon. 2010. "Population Genetic Data Suggest a Role for Mosquito-Mediated Dispersal of West Nile Virus across the Western United States." *Molecular Ecology* 19 (8):1573–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04577.x>.
- Verhagen, Josanne H, Jacintha G B Van Dijk, Oanh Vuong, Theo Bestebroer, Pascal Lexmond, Marcel Klaassen, and Ron A M Fouchier. 2014. "Migratory Birds Reinforce Local Circulation of Avian Influenza Viruses" 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112366>.
- Villordo, Sergio M., Juan M. Carballeda, Claudia V. Filomatori, and Andrea V. Gamarnik. 2016. "RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation." *Trends in Microbiology* 24 (4):270–83. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002>.
- Weaver, Scott C, and Reisen William K. 2010. *Present and Future Arboral Threats*. Vol. 85. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>.Present.
- Weissenböck, Z. Hub?lek, T. Bakonyi, and N. Nowotny. 2010. "Zoonotic Mosquito-Borne Flaviviruses: Worldwide Presence of Agents with Proven Pathogenicity and Potential Candidates of Future Emerging Diseases." *Veterinary Microbiology* 140 (3–4):271–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.025>.
- Weissenböck, Jolanta Kolodziejek, Angelika Url, Helga Lussy, Barbara Rebel-Bauder, and Norbert Nowotny. 2002. "Emergence of Usutu Virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe." *Emerging Infectious Diseases* 8 (7):652–56. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020094>.
- White, Gregory S., Kelly Symmes, Pu Sun, Ying Fang, Sandra Garcia, Cody Steiner, Kirk Smith, William K. Reisen, and Lark L. Coffey. 2016. "Reemergence of St. Louis Encephalitis Virus, California, 2015." *Emerging Infectious Diseases* 22 (12):2185–88. <https://doi.org/10.3201/eid2212.160805>.
- Wiethoelter, Anke K., Daniel Beltrán-Alcrudo, Richard Kock, and Siobhan M. Mor. 2015. "Global Trends in Infectious Diseases at the Wildlife–livestock Interface." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (31):9662–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422741112>.
- Wood, Chelsea L., and Kevin D. Lafferty. 2013. "Biodiversity and Disease: A Synthesis of Ecological Perspectives on Lyme Disease Transmission." *Trends in Ecology & Evolution* 28 (4):239–47. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.011>.
- Wood, Chelsea L., Kevin D. Lafferty, Giulio DeLeo, Hillary S. Young, Peter J. Hudson, and Armand M. Kuris. 2014. "Does Biodiversity Protect Humans against Infectious Disease?" *Ecology* 95 (4). <https://doi.org/10.1890/13-1041.1>.