



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD FILOGENÉTICA Y POTENCIAL DE TRANSMISIÓN INTERESPECIE DEL VIRUS DE INFLUENZA EN QUIRÓPTEROS DE MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA

MANUEL OMAR MOGUEL VILLA

TUTOR PRINCIPAL

DR. RAFAEL OJEDA FLORES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. OSCAR RICO CHÁVEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

DR. RAFAEL ÁVILA FLORES

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias

A mi madre Imelda Villa Morales y mi padre Manuel Moguel Cos por su apoyo incondicional, por alentarme en todo momento e inculcarme los valores necesarios para desarrollarme como persona. Gracias por creer en mi y su infinito amor. Este logro con todo honor es para ustedes.

A mis abuelos por ser un ejemplo en mi aprendizaje.

A Geraldine Bezares por sus consejos, apoyo y aliento en cada momento. Por creer en mi, motivarme y acompañarme en los buenos y malos momentos buenos es un orgullo tenerte cerca.

Con cariño a mis amigos.

David Pereyra, Cesar de la Rosa, José Antonio Sánchez, Uriel Alejandro Ruiz, Hugo Mendoza y Andrés Mauricio López. Gracias por sus consejos y apoyarme en las buenas y las malas.

Agradecimientos

A mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y al programa de posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de la producción y de Salud Animal. Por mi desarrollo como individuo, mi formación académica y crecimiento profesional.

A mi tutor Dr. Rafael Ojeda Flores por la confianza en permitirme participar en este proyecto, por el apoyo y paciencia en todo momento en este proceso de desarrollo académico. Por todo el gran aporte que influyo en el ser investigador, por su orientación y compartir su conocimiento. Y por esas largas charlas que me hicieron crecer como persona. Por estar en el campo enseñándome y dando consejos de manejo de murciélagos.

A mi asesor Dr. Oscar Rico Chávez, por iniciarme el gusto de la investigación en licenciatura, por compartir sus experiencias que incentivaron mi curiosidad por adentrarme a los temas de ecología de enfermedades. Por enseñarme a trabajar con murciélagos y fomentarme el uso de recursos estadísticos computacionales. Por la confianza, el apoyo y paciencia en todo este proyecto.

A mi asesor Rafael Ávila Flores, por la confianza, su colaboración y el apoyo en todo momento del proyecto.

A todos los integrantes del Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una Salud, particularmente a Jessica Mateus, Liliana Gaytán y Cecilia Montoya, por su gran colaboración en el trabajo de laboratorio y de campo.

A la Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM, especialmente al Dr. Rene Segura y la Dra. Rebeca Martínez, por la colaboración, capacitación y asesoría en el procesamiento de las muestras.

Al personal del Laboratorio de Genética de la FMVZ-UNAM, al Dr. Rogelio Alonso por abrirme las puertas, por su apoyo y conocimiento. Asimismo, a Amanda, Jessica, Pablo y Vianey por su apoyo, capacitación y compartirme todo su conocimiento en el procesamiento de las muestras.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido durante la maestría. Así como al proyecto PAPIIT IA-205916, por el financiamiento que se otorgó a este proyecto de investigación.

A todos los murciélagos que participaron para la obtención de muestras y datos.

Resumen

Históricamente el virus de Influenza ha sido causante de grandes pandemias con importantes pérdidas económicas y altas morbilidades en humanos. Actualmente, se sabe que las aves acuáticas silvestres (Anseriformes y Charadriiformes) son el reservorio natural de 16 subtipos de Hemagutinina y 9 de Neuraminidasa y que desempeñan un papel fundamental en la transmisión de los virus de Influenza a nivel local, regional y continental. En el 2012 y 2013 se identificaron en murciélagos nuevos subtipos de Influenza en Guatemala (H17N10) y Perú (H18N11) respectivamente, lo cual plantea la hipótesis de que los quirópteros podrían ser reservorios de virus de Influenza. México está ubicado en la zona de transición entre dos regiones biogeográficas, la Neártica y la Neotropical. Esto favorece la convergencia de muchos grupos taxonómicos, incluyendo mamíferos y aves. El país ostenta el tercer lugar de riqueza de mamíferos, entre los cuales los murciélagos son uno de los órdenes más abundantes con 138 especies. El objetivo de este estudio es determinar la presencia y caracterizar la diversidad viral de Influenza en murciélagos de Morelos, Chiapas y Veracruz mediante técnicas moleculares y serológicas. Se capturaron un total de 413 murciélagos de 35 especies diferentes a los cuales se colectaron muestras con hisopo del recto y sangre de la vena radial de cada individuo. Para el diagnóstico molecular se formaron un total de 101 pools. Los pools se analizaron por duplicado por la prueba de RT-PCR dirigida a la región altamente conservada del gen que codifica la proteína de Matriz (M), dando resultados negativos en ambas ocasiones. Además, se desarrolló una prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra el virus de Influenza, el

ensayo emplea como antígeno un virus H7N3 purificado de Influenza Aviar, con el objetivo de que el antígeno M, que contiene el virus, pudiera ser identificado por los anticuerpos contra Influenza presentes en los murciélagos expuestos a cualquier serogrupo viral. El análisis arrojó trece muestras positivas, siete correspondientes al género *Sturnira sp.*, dos en la especie *Carollia sowelli*, dos en *Sturnira ludovici*, un *Carollia perspicillata* y un *Pteronotus parnelli* . Es necesario continuar generando nuevas técnicas de detección que nos permitan identificar la diversidad y circulación del virus de Influenza, así como, aumentar los esfuerzos de muestreo en las poblaciones y comunidades de murciélagos de México, esto resulta fundamental para generar información sobre la diversidad viral, mecanismos de transmisión, rangos de distribución, y otros factores relacionados con la ecología viral, además de los impactos asociados a la influencia antropogénica sobre los sistemas naturales de los que los murciélagos forman parte.

Abstract

Influenza virus has caused major pandemics with significant economic losses and high morbidity. Currently, it is known that wild water birds (Anseriformes and Charadriiformes) are the natural reservoir of 16 subtypes of Hemagutinin and 9 of Neuraminidase and that they play a fundamental role in the transmission of influenza viruses at local, regional and continental levels. In 2012 and 2013, new subtypes of Influenza were identified in bats in Guatemala (H17N10) and Peru (H18N11) respectively, which raises the hypothesis that chiroptera could be reservoirs of Influenza virus. Mexico is located in the transition zone between two biogeographical regions, the Antarctic and the Neotropical. This favors the convergence of many taxonomic groups, including mammals and birds. The country boasts the third place of mammalian wealth, among which bats are one of the most abundant orders with 138 species. The objective of this study is to determine the presence and characterize the viral diversity of Influenza in bats of Morelos, Chiapas and Veracruz through molecular and serological techniques. A total of 413 bats of 35 different species were captured and samples were collected rectal swabs and blood from the radial vein of each individual. For the molecular diagnosis, a total of 101 pools were formed. Clusters were analyzed twice by the RT-PCR test directed to identify the highly conserved region of the gene Matrix (M), giving negative both times they were analyzed. In addition, the indirect ELISA test for the detection of antibodies against of the Influenza virus was developed, from which thirteen positive samples were obtained, seven corresponding to *Sturnira sp.*, two to *Carollia sowelli*, two to *Sturnira ludovici*, one to *Carollia perspicillata* and one to *Pteronotus parnelli*. It is necessary

to continue generating new detection techniques that allow us to identify the diversity and circulation of Influenza Virus, as well as increase sampling efforts in populations and communities of bats in Mexico, this is essential to generate information on viral diversity, mechanisms of transmission, distribution ranges, and other factors related to viral ecology, as well as the impacts associated with the anthropogenic influence on the natural systems bats.

Contenido

<i>Dedicatorias</i>	<i>ii</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>iii</i>
<i>Resumen</i>	<i>v</i>
<i>Abstract</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de cuadros</i>	<i>xi</i>
<i>Lista de figuras</i>	<i>xi</i>
<i>Introducción</i>	<i>9</i>
Breve historia del virus de influenza.....	<i>12</i>
Virus de influenza.....	<i>13</i>
Diversificación viral de los virus de influenza.....	<i>17</i>
Transmisión interespecie de los virus de influenza.....	<i>18</i>
Factores moleculares involucrados en la transmisión interespecie.....	<i>20</i>
Factores ecológicos involucrados en la transmisión interespecie.....	<i>23</i>
Fauna silvestre y doméstica como hospederos de los virus de influenza.....	<i>24</i>
Murciélagos y su relación con los virus de influenza.....	<i>27</i>
<i>Justificación</i>	<i>33</i>
<i>Hipótesis</i>	<i>34</i>
<i>Objetivo general</i>	<i>34</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>34</i>
<i>Metodología</i>	<i>35</i>
Área de estudio.....	<i>35</i>
Diseño de estudio, captura y toma de muestras.....	<i>40</i>
<i>Detección molecular</i>	<i>41</i>
Extracción de ácidos nucleicos.....	<i>41</i>
RT-PCR en tiempo real.....	<i>42</i>
<i>Detección serológica</i>	<i>43</i>
Preparación de sueros.....	<i>43</i>
Análisis serológico.....	<i>44</i>
<i>Resultados</i>	<i>46</i>
Capturas por escala regional.....	<i>46</i>

Riqueza específica.....	47
Abundancia relativa.....	47
Escala local.....	47
Abundancia relativa.....	48
Detección molecular	52
Análisis serológico	52
<i>Discusión</i>	56
<i>Conclusiones</i>	67
<i>Anexo 1</i>	68
<i>Anexo 2</i>	69
<i>Referencias</i>	74

Lista de cuadros

Cuadro 1. Genes y proteínas del virus de influenza tipo A.

Cuadro 2. Especies positivas a H17 y H18 en Guatemala, Perú y Brasil.

Cuadro 3. Ubicación de las localidades de muestreo.

Cuadro 4. Fechas de muestreo por sitio.

Cuadro 5. Condiciones en la amplificación de la qRT-PCR.

Cuadro 6. Interpretación de la prueba de ELISA.

Cuadro 7. Murciélagos positivos a influenza H7.

Lista de figuras

Figura 1. Estructura del virus de influenza A.

Figura 2. Receptores celulares.

Figura 3. Mapa del área de estudio de la reserva de la Biósfera de Quilamula, Morelos.

Figura 4. Mapa del área de estudio de la reserva de la Biósfera de Montes Azules, Chiapas.

Figura 5. Mapa del área de estudio de Veracruz.

Figura 6. Abundancia total de especies capturadas.

Figura 7. Riqueza de especies por localidad.

Figura 8. Composición de especies por localidad.

Figura 9. Gráfica de RT-PCR en tiempo real de muestras de hisopados rectales de los murciélagos.

Figura 10. Densidades ópticas de las muestras de murciélagos.

Figura 11. Valores *SP* de las muestras de murciélagos.

Introducción

En las últimas décadas las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) han despertado gran interés a escala global debido al gran impacto que generan en la economía y salud pública (Dixon, Dar, y Heymann, 2014). Éstas se han definido como aquellas enfermedades que aparecen por primera vez en una población, o que existían previamente pero que incrementan rápidamente su incidencia o rango geográfico (Dobson y Foufopoulos, 2001).

La aparición de estas enfermedades se asocia principalmente a una serie de factores que en su mayoría están vinculados a las actividades humanas. Entre estos factores se encuentran la creciente población humana, el movimiento de animales, el cambio en las prácticas agrícolas y la constante reducción e invasión de hábitats. Estos y otros factores también generan cambios importantes en la estructura y función de los ecosistemas, de tal manera que animales silvestres, animales domésticos y humanos se ven obligados a estar en estrecho contacto, lo cual propicia la modificación de los patrones de distribución y la dinámica de las enfermedades infecciosas mediante alteraciones en su ocurrencia y distribución (Daszak, Cunningham, y Hyatt, 2000, 2001; Mackenzie y Jeggo, 2013).

Se ha estimado que 60.3% de las EIE son de origen zoonótico y que de éstas aproximadamente 72% provienen de la fauna silvestre (Jones et al., 2008). En la mayoría de las ocasiones los agentes causales de estas enfermedades se han transmitido con éxito de poblaciones de fauna silvestre al humano debido al proceso

de salto de hospedero o “*spillover*”. Este proceso parte de la invasión inicial de un patógeno que podría o no persistir a lo largo del tiempo en un nuevo hospedero y regularmente ocurre cuando una población de reservorios con alta prevalencia de patógenos entra en contacto con una nueva población hospedera susceptible. De tal manera que la infección se transmite desde la población de reservorios y puede o no transmitirse dentro de la población de hospederos susceptibles (Longdon, Brockhurst, Russell, Welch, y Jiggins, 2014).

Los animales silvestres, especialmente los mamíferos y las aves son hospederos de una gran cantidad de virus de los cuales la mayoría no tenemos conocimiento alguno. En algunos casos, la infección por estos virus no genera enfermedad en sus hospederos naturales. Sin embargo, algunos de estos virus pueden infectar a otras especies y en ciertos casos la transmisión entre especies puede llevar a la transmisión al ser humano (Bengis et al., 2004; Mackenzie y Jeggo, 2013). Los reservorios naturales asociados a los virus zoonóticos emergentes, principalmente son especies de roedores, ungulados, primates, carnívoros, aves y murciélagos. Los murciélagos a menudo se comparan con los roedores, respecto a su papel como reservorios naturales de patógenos zoonóticos. Aproximadamente 9.8% de las especies de murciélagos se han reconocido como reservorios y se relacionan aproximadamente con un tercio del número total de zoonosis (Han, Kramer, y Drake, 2016).

El orden Chiroptera está compuesto aproximadamente por 1240 (> 1400 al día de hoy según datos no publicados) especies de murciélagos (Chan, To, Tse, Jin, y Yuen, 2013). Al respecto, en México existe el registro de 138 especies de murciélagos representadas en ocho familias (Medellín, Arita y Sánchez, 1997). Los quirópteros se distribuyen en todos los continentes a excepción de los polos. Se caracterizan por presentar una alta diversidad ecológica, morfológica y funcional, además de adaptaciones sensoriales e historias de vida particulares que incluyen su capacidad de vuelo, ecolocación, hibernación, vida gregaria, gran longevidad, altas densidades poblacionales, sistemas inmunes privilegiados y una gran diversidad de gremios tróficos. Características que han sido asociadas con el elevado potencial de asociación con microorganismos causales de enfermedad (Calisher et al., 2006; Chan et al., 2013; Mandl et al., 2015).

La interacción entre murciélagos y virus es un proceso que ha llevado miles e incluso millones de años (Wibbelt, Moore, Schountz, y Voigt, 2010). Esto es debido a que los quirópteros poseen características biológicas, ecológicas, genéticas e inmunológicas únicas. Las cuales pueden tener incidencia en la gran diversidad viral que se ha descrito en este grupo de mamíferos (Chan, To, Tse, Jin, y Yuen, 2013; Hayman et al., 2013). El gran interés en los virus relacionados a los quirópteros es resultado del notorio incremento en el número de patógenos emergentes y reemergentes hospedados por estas especies. Al respecto, se han identificado aproximadamente 24 familias virales en diferentes especies de murciélagos, entre las que destacan las familias *Rhabdoviridae*, *Paramixoviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Coronaviridae* y *Orthomixoviridae* (Luis et al., 2013; Smith y Wang,

2013; Tong et al., 2012, 2013). Estas familias virales engloban géneros con gran importancia para la salud pública y animal, por ejemplo, los virus de rabia, Marbug, Ébola, Nipah, Hendra, los coronavirus causantes de síndrome respiratorio agudo y grave (SARS), síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y el virus de influenza, entre otros (Calisher et al., 2006; Tong et al., 2012, 2013)

El desarrollo de técnicas moleculares como PCR y secuenciación de nucleótidos, complementadas con pruebas serológicas ha permitido identificar y caracterizar una gran cantidad de virus que circulan en las poblaciones de fauna silvestre, además de que estas técnicas también han ayudado al diagnóstico y vigilancia epidemiológica de algunas enfermedades infecciosas emergentes en la población humana (He et al., 2013; Smith y Wang, 2013).

Breve historia del virus de Influenza

El virus de influenza es causante de una enfermedad infecciosa emergente que históricamente ha ocasionado grandes pandemias con altas mortalidades en humanos?. Entre las más conocidas y documentadas se encuentran la “gripe española” de 1918 (H1N1) que causó la muerte de aproximadamente 50 millones de personas siendo la más devastadora de la historia, otras pandemias con altas mortalidades fueron la llamada “influenza asiática” (H2N2) en 1957 y la “gripe de Hong Kong” (H3N2) en 1968 (Schrauwen y Fouchier, 2014).

Recientemente en 2009, el virus de influenza (H1N1) se convirtió en una de las primeras pandemias que ocurrieron en el siglo XXI, en la que México resultó gravemente afectado con un elevado número de muertes (Dixon et al., 2014), aunque los principales impactos se dieron en el nivel económico. Actualmente, los virus de influenza son causantes de epidemias recurrentes anuales, lo que da como resultado de tres a cinco millones de casos de enfermedad grave y de 250 000 a 500 000 muertes en todo el mundo, por lo que es importante llevar a cabo una vigilancia de la enfermedad sobre todo en países en vías de desarrollo. La vigilancia de la enfermedad junto con estudios enfocados en los distintos factores involucrados en la dinámica de transmisión son esenciales para entender de mejor manera la epidemiología de la influenza, evaluar los subtipos circulantes y verificar la eficiencia de las vacunas, así como también mitigar los factores de riesgo para el surgimiento de nuevos brotes de enfermedad (Fraser et al., 2009; Kilbourne, 2006; McCloskey, Dar, Zumla, y Heymann, 2014; Valdez, 2013).

Virus de influenza

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y se clasifican en cuatro géneros o tipos: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gamminfluenzavirus* y *Deltainfluenzavirus* (ICTV, 2017). Los virus de influenza tipo A del género *Alphainfluenzavirus*, se categorizan a su vez en diferentes subtipos dependiendo de las diferencias inmunológicas de sus proteínas. Los virus de influenza tipo A están relacionados con las grandes pandemias, además de circular y replicarse en diferentes especies de aves y mamíferos tanto domésticos como

silvestres (Cheung & Poon, 2007; Henritzi et al., 2019; Manjarrez Zavala y Arenas López, 1999)

Estos virus tienen un genoma constituido por ARN de cadena sencilla segmentado. El número de segmentos varía dependiendo del tipo: específicamente, los virus de Influenza tipo A están constituidos por ocho segmentos de ARN que codifican para 10 proteínas (cuadro 1 y figura 1) (Webster, Bean, Gorman, Chambers, y Kawaoka, 1992). Los virus de influenza A están constituidos principalmente por una nucleocápside compuesta por el genoma viral y una envoltura de bicapa lipídica y tres proteínas de superficie codificadas por el virus: Hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y M2 (Cheung y Poon, 2007; Manjarrez Zavala y Arenas López, 1999). La HA y NA son glicoproteínas que definen a los subtipos virales por diferencias antigénicas. Al respecto, anteriormente se conocían 16 subtipos de HA y 9 de NA, sin embargo, recientemente se detectaron dos nuevos subtipos de HA y NA en murciélagos de Guatemala y Perú. Estos estudios revelaron que los nuevos virus de murciélagos presentaban una alta divergencia genética y filogenética con respecto a los subtipos de influenza previamente conocidos, por lo que se consideró designarlos como H17N10 y H18N11 (Tong et al., 2012, 2013).

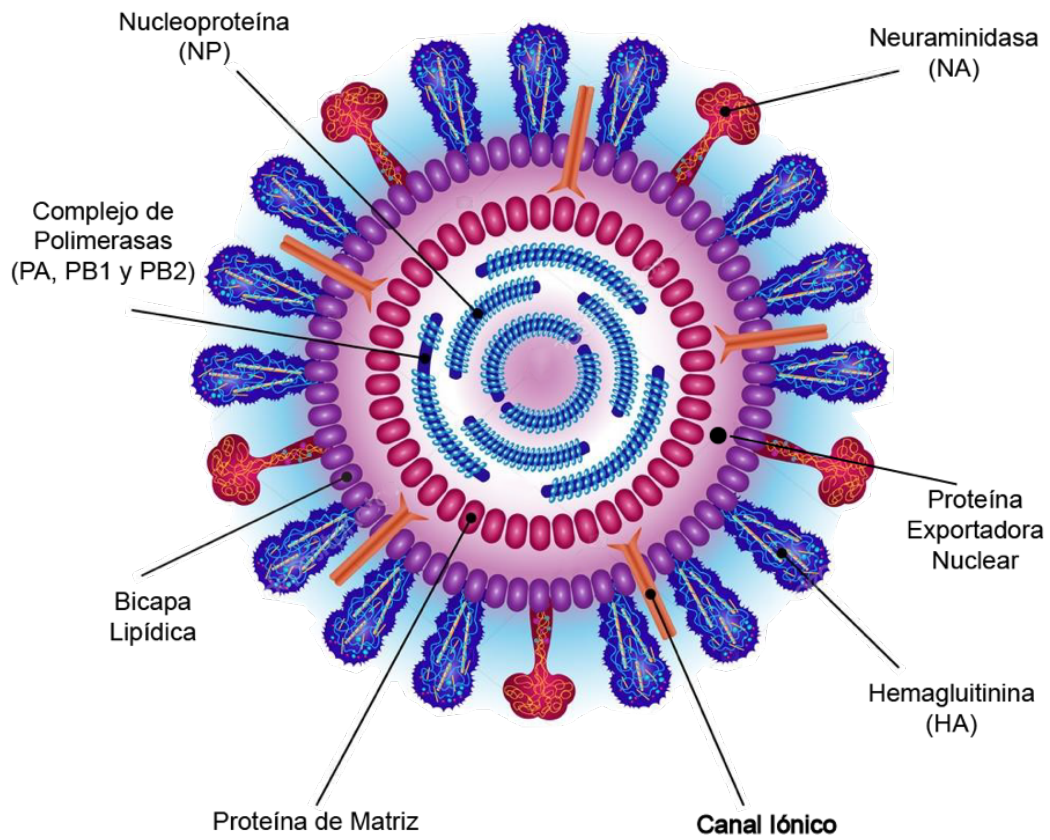


Figura 1. Estructura del virus de Influenza A. Adaptado de Salazar et al. (2010).

Cuadro 1. Genes y proteínas del virus de influenza A. Adaptado de Munoz *et al.* (2015).

Gen	Nombre de la proteína	Función
1	Polimerasa básica 2 (PB2)	Proteína interna, transcripción y replicación viral.
2	Polimerasa básica 1 (PB1)	Proteína interna, replicación viral. Inducción de la respuesta proinflamatoria.
3	Polimerasa ácida (PA)	Proteína interna, replicación viral.
4	Hemaglutinina (HA)	Glicoproteína de superficie. Unión viral a receptores celulares. Fusión de membrana viral y endosomal. Específica por subtipo viral.
5	Nucleoproteína (NP)	Proteína de nucleocápside. Encapsidación. Recubrimiento de ARN. Transcripción de ARN.
6	Neuraminidasa (NA)	Proteína de superficie. Liberación de progenie viral de las células huésped. Específica de subtipo viral.
7	Matriz 1 (M1)	Empaquetamiento viral. Estabilidad de la proteína de membrana. Canal de iones transmembrana.
	Matriz 2 (M2)	Canal de iones transmembrana. Liberación de RNPs (Ribonucleoproteínas) al citoplasma celular.
8	No estructural 1 (NS1)	Proteínas internas. Antagonista la respuesta inmune innata.
	No estructural 2 (NS2)	Regulación del ciclo viral en la transcripción de ARNm.

Diversificación viral de los virus de influenza

La gran variabilidad genética y antigénica que exhiben los virus de influenza A, se debe en gran medida, a la conformación particular de su genoma, sus altas tasas de mutación y a la recombinación frecuente de sus segmentos genómicos. Existen dos diferentes mecanismos en la evolución antigénica de los virus de influenza: la deriva antigénica (*Drift*) y el reordenamiento antigénico (*Shift*) (Wikramaratna, Sandeman, Recker, y Gupta, 2013). La deriva antigénica es el resultado de mutaciones puntuales que resultan en cambios de aminoácidos en las proteínas HA y NA, así como también en los genes internos, lo que da como resultado la alteración de los sitios antigénicos y en ocasiones a la evasión de la respuesta inmune humoral (Wikramaratna et al., 2013). El reordenamiento genético o recombinación genética combina dos o más segmentos virales, cuando dos o más variantes virales coinfectan al mismo individuo. De tal manera que si un evento de coinfección ocurre, el intercambio de segmentos entre diferentes virus puede generar nuevas variantes virales (Chan et al., 2013; Nelson y Vincent, 2014). De esta manera, se generan múltiples cambios a nivel de la secuencia genómica de las distintas variantes, lo que se refleja rápidamente en las proteínas que pueden o no ser reconocidas por el sistema inmune del individuo infectado. Estos mecanismos de variación genética, a su vez, conducen a que la respuesta inmune pueda tener poco o ningún efecto cuando una nueva variante infecta (Potter, 2001; Webster et al., 1992). Es importante mencionar que los virus de influenza tienen una alta tasa de error durante la replicación de sus genomas. La polimerasa viral (RpdR) carece de la actividad necesaria para corregir errores introducidos, por lo que aumenta la probabilidad de incorporar mutaciones en la secuencia de nucleótidos de sus genes. En este

sentido, se sabe que la tasa de error que exhibe esta polimerasa viral es de 1×10^3 a 1×10^5 , es decir, que introduce una mutación por cada mil o cien mil nucleótidos copiados (Stech et al, 1999, Salazar et al, 2010). Debido a su alta tasa de mutación, solo una mínima fracción de copias generadas son idénticas a las parentales. De esta manera, se genera en la progenie del virus una gama de genomas parecidos, denominados cuasiespecies. Las cuasiespecies virales son genomas virales mutantes y recombinantes que están estrechamente relacionadas sin ser idénticas y que han estado sometidas a constantes variaciones genéticas (Domingo et al, 1985). La generación de cuasiespecies por un lado mejoran la probabilidad del virus de adaptarse con rapidez a un nuevo hospedero y, por otro lado, permite la producción de variantes defectuosas que se extinguen (Andino & Domingo, 2015).

Transmisión interespecie de los virus de influenza

Los virus de influenza son patógenos altamente versátiles y flexibles, tanto en sus características moleculares descritas anteriormente, como en lo relacionado a las asociaciones ecológicas entre estos virus y distintos hospederos, y ambientes. La probabilidad de que un virus de influenza se transmita entre diferentes especies depende de múltiples factores. Entre otros, existen tres procesos clave para que el virus de influenza sea transmitido eficientemente: la interacción del hospedero con el virus, la interacción interespecie y los contactos intraespecie entre poblaciones susceptibles (Harris et al., 2017; Kuiken et al., 2006; Webster et al., 1992). En este sentido, para que un virus pueda transmitirse de un hospedero a otro debe atravesar algunas barreras de entrada y encontrar su camino hacia los tejidos en donde va a replicarse. Una vez que se encuentra en los tejidos apropiados, el virus debe

encontrar un receptor e ingresar a las células antes de replicarse. La especificidad del receptor regula la entrada del virus en las células (Webster et al., 1992). Por ejemplo, las moléculas de hemaglutinina de los virus de influenza aviares se unen a receptores de ácido siálico $\alpha 2,3$ -SA, mientras que las hemaglutininas de los virus de influenza de humanos prefieren los receptores $\alpha 2,6$ -SA. Una vez que el virus se replica dentro del hospedero, por medio de excreciones respiratorias, entéricas o urogenitales es transmitido a nuevos hospederos (Chan et al., 2013; Webster et al., 1992).

El contacto interespecie es fundamental en la transmisión de los virus de influenza, en este sentido se sabe que el aumento en las tasas de crecimiento y consumo de la población humana está reduciendo dramáticamente las barreras geográficas y ambientales, lo cual conlleva que las poblaciones de hospederos modifiquen su distribución y comportamiento. Esto ha generado que el contacto entre individuos de distintas especies, tanto domésticas como silvestres, sea más estrecho lo cual favorece la transmisión viral. Suponiendo que el virus pueda transmitirse entre especies, la persistencia de la infección depende de cómo se propague a través de la red de contactos entre los hospederos. Además, se requiere de múltiples mutaciones adaptativas para que el virus se establezca con éxito en un nuevo hospedero receptor. En general, la probabilidad de que persista el virus de influenza en una nueva especie depende del tamaño de la población y del grado en que las especies hospederas y susceptibles entran en contacto (Gortazar et al., 2014; Kuiken et al., 2006).

Factores moleculares involucrados en la transmisión interespecie

Desde el enfoque molecular se puede destacar la participación de dos glicoproteínas en la replicación del virus; la Hemaglutinina (HA), molécula de unión del virus con los receptores de ácido siálico en la superficie de la célula del hospedero, y la Neuraminidasa (NA), importante durante las etapas finales de la infección, donde ésta separa al ácido siálico (SA) de la célula, lo que facilita la liberación de la progenie viral de la célula del hospedero (Zhu et al., 2012). En este sentido se ha demostrado que las hemaglutininas de los virus de influenza de aves presentan tropismo a los receptores de ácido siálico $\alpha 2,3$ -SA que se expresan en el tracto gastrointestinal de las aves y para el caso de humanos y algunos mamíferos las hemoaglutininas presentan afinidad preferentemente a los receptores de ácido siálico $\alpha 2,6$ -SA que se encuentran en el tracto respiratorio. Recientemente, se han encontrado ambos receptores de ácido siálico en murciélagos que son compatibles con la unión de virus de influenza aviar y humana (Chan et al., 2013; Chothe et al., 2017; Munoz et al., 2015). Esta característica coincide con aquella que se manifiesta en los cerdos quienes poseen los dos tipos de receptores ubicados en la tráquea el $\alpha 2,3$ -SA y el $\alpha 2,6$ -SA: este rasgo les confiere la capacidad de “mezclar” diferentes virus a través de mutaciones que pueden ser resultado de la deriva antigénica o recombinación genética y la consecuente generación de nuevos subtipos de virus (Chan et al., 2013; Nelson & Vincent, 2014).

Anteriormente se creía que los cerdos eran los únicos capaces de fungir como “mezcladores” de diferentes subtipos de influenza debido a que poseen dos diferentes receptores de ácido siálico, sin embargo, en un estudio reciente se demostró que también existe una co-expresión de ambos receptores de ácido siálico tanto el aviar ($\alpha 2,3$ -SA) como el humano ($\alpha 2,6$ -SA) en el tracto respiratorio y gastrointestinal del murciélago *Sturnira lilium*, estos receptores son afines a la unión del virus H5N2 aviar y H1N1 humano (figura 2) (Chothe et al., 2017). Se ha sugerido que este nuevo hallazgo, aunado a algunas de las características biológicas, ecológicas, evolutivas e inmunológicas que poseen estos mamíferos podrían participar en los procesos de mantenimiento y propagación viral. Con el reciente hallazgo de dos nuevos subtipos de influenza en murciélagos (H17N10 y H18N11) algunos autores proponen que estos virus requieren cambios significativos antes de que puedan infectar y propagarse entre los humanos. Además, se ha sugerido que los murciélagos podrían ser susceptibles a diferentes subtipos de influenza e incluso apoyar la coinfección de influenza aviar y humana. Por lo tanto, se cree que los murciélagos actúan como hospederos con un importante papel dentro del proceso de diversificación viral (Chothe et al., 2017; Plowright et al., 2015; Tong et al., 2012, 2013).

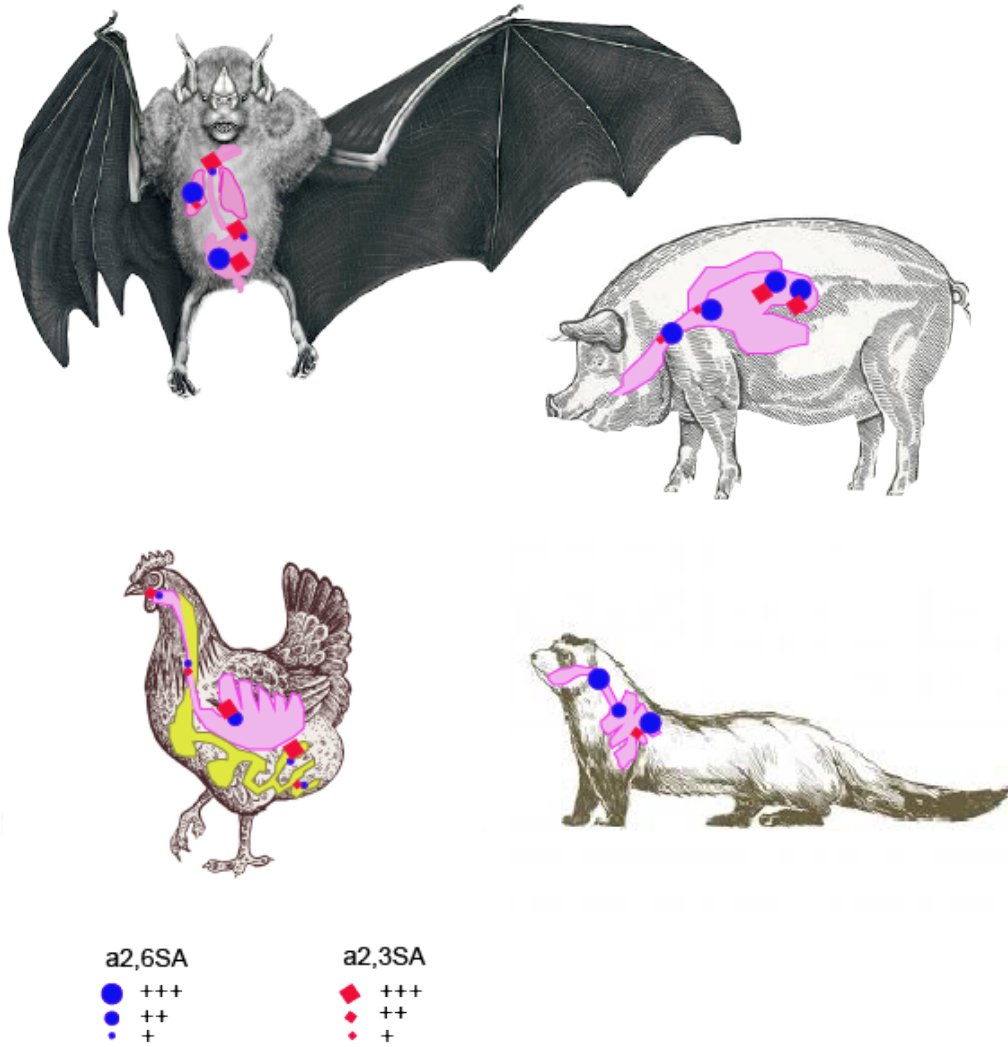


Figura 2. Receptores celulares. Adaptado de Chothe et al., 2017; De Graaf y Fouchier, 2014.

Factores ecológicos involucrados en la transmisión interespecie

Existen diferentes factores ecológicos que pueden facilitar la transmisión de los virus de influenza entre diferentes especies. Como se mencionó anteriormente, es esencial que exista un contacto entre especies para favorecer esta transmisión. En este sentido, la interfaz fauna silvestre - animal doméstico – ser humano, que está definida como el contacto continuo entre humanos y animales tanto de sus entornos como de sus productos, conlleva a una serie de factores que facilitan la transmisión de estos virus entre diferentes especies. Además, se ha reconocido que esta interfaz favorece la diversificación viral a través de una gran variedad de hospederos silvestres y domésticos (Gortazar et al., 2014; Harris et al., 2017; Wiethoelter, Beltrán-Alcrudo, Kock, y Mor, 2015). Por ejemplo, el medio ambiente costero proporciona una interfaz entre hábitats marinos y terrestres donde las aves acuáticas silvestres conviven temporalmente con mamíferos marinos, lo que facilita la transmisión interespecie del virus. Al respecto, se ha identificado que el contacto cercano con aves costeras o las heces de las aves en los lugares de alimentación actúa como fuente de transmisión de aves a mamíferos acuáticos (Harris et al., 2017; Runstadler, Hill, Hussein, Puryear, & Keogh, 2013).

De manera similar, la transmisión del virus de influenza de animales a humanos se ha asociado principalmente con el contacto y exposición directa e indirecta con animales infectados. Sin embargo, existen comportamientos humanos que favorecen el riesgo de transmisión; por ejemplo, la visita a mercados de aves de corral, la preparación de alimentos, el contacto directo con fuentes de agua

ocupadas por aves de corral y aves silvestres y actividades realizadas por trabajadores en sistemas de producción (Harris et al., 2017).

Fauna silvestre y doméstica como hospederos de los virus de influenza

Las aves acuáticas silvestres, particularmente aquellas de los órdenes Anseriformes y Charadriiformes se han reconocido como los principales reservorios naturales de 16 subtipos de HA y 9 de NA y generalmente permanecen como hospederos asintomáticos (Mehle, 2014; Olsen, 2014). Sin embargo, este grupo de aves desempeña un papel fundamental en la transmisión de los virus de influenza a nivel local, regional y continental. Ya que se distribuyen globalmente y utilizan la migración como estrategia para ocupar hábitats estacionalmente (Mehle, 2014; Olsen, 2014). Se ha observado que existe una interfaz entre aves acuáticas y domésticas durante su alimentación o hibernación, por lo cual, las aves acuáticas llegan a transmitir diferentes subtipos virales a las aves domésticas (Runstadler et al., 2013). Los virus de influenza pueden establecerse entre las aves de corral y causar dos formas de enfermedad. Los virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (IABP), que generalmente causan infecciones asintomáticas, enfermedades respiratorias leves o caída de la postura en aves de corral. Algunos virus IABP pueden mutar en las poblaciones de aves de corral y convertirse en virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP), estos causan una enfermedad grave con mortalidades de 90-100% de una parvada (Munoz et al., 2015). En algunas ocasiones, las aves silvestres pueden estar en contacto con otras aves domésticas o mamíferos domésticos como el cerdo, que eventualmente puede tener

contacto con el humano y participar en la dinámica de transmisión viral (Chan et al., 2013).

La mayoría de los estudios sobre la dinámica de transmisión de los virus de influenza se han enfocado en la transmisión de las aves silvestres a las aves domésticas y al ser humano, sin embargo, actualmente se reconoce que las aves no son los únicos vertebrados que participan en los saltos taxonómicos de estos virus (Chan et al., 2013; Runstadler et al., 2013). En este sentido, existen algunos reportes del papel de los mamíferos como hospederos de diferentes subtipos del virus de influenza; como los cerdos, que como anteriormente se mencionó actúan como hospederos intermediarios favoreciendo la diversificación de los virus de influenza, debido a su capacidad de infectarse tanto de virus de influenza aviar como con virus de influenza humana. Esto favorece el intercambio de segmentos de genoma viral a través de la recombinación genética y la consecuente generación de nuevos subtipos de virus (Nelson y Vincent, 2015). Otros mamíferos domésticos en los que se ha reportado la presencia del virus de influenza son los perros, que dada su cercanía con caballos se ha identificado la infección por el subtipo H3N8. También, se han reportado infecciones de H5N1 en gatos que se alimentaron de aves infectadas (Harris et al., 2017).

La relación de los virus de influenza con los mamíferos silvestres es un tema poco estudiado, sin embargo, existen reportes de saltos taxonómicos de algunos subtipos del virus de influenza de aves a estos vertebrados como, por ejemplo; en roedores (*Mus musculus*) que fueron detectados como positivos después de un brote de baja

patogenicidad de H5N8 (Runstadler et al., 2013). El conejo de roca (*Orchotona curzoniae*) es otro mamífero silvestre en el que se detectó el virus de influenza H5N1 de alta patogenicidad, una variante viral que circula en aves acuáticas migratorias (Runstadler et al., 2013). Otro mamífero en el cual se ha reportado infección es el visón europeo (*Mustela lutreola*) en el que se especula una transmisión de H1N2 por consumir carne de pavo cruda (Harris et al., 2017). Especies silvestres que son abundantes en áreas urbanas como los mapaches (*Procyon lotor*) también han sido detectados como seropositivos a los subtipos que comúnmente circulan en aves silvestres acuáticas (H1, H3, H4 y H10) (Runstadler et al., 2013). Se ha identificado la presencia del subtipo H7N7 en focas (*Phoca vitulina*) y ballenas (*Globicephala melaena*) debido al contacto directo o indirecto en las zonas donde se alimentan las aves costeras. Recientemente, también se ha podido observar que las poblaciones de focas en E.U.A. morían a causa del subtipo H3N8 aviar. En otro estudio se pudo aislar H10N7 causante de una gran mortalidad en focas de Suecia (Harris et al., 2017). Por último, los quirópteros constituyen un grupo de mamíferos que ha sido intensamente monitoreado en busca de virus de distintas familias. Recientemente, han sido objeto de estudios orientados hacia la detección de virus de influenza. En estos animales se han identificado los subtipos H9, H3 y subtipos virales completamente divergentes con relación a las variantes anteriormente descritas, tal es el caso de los subtipos H17N10 y H18N11 (Brunotte, Beer, Horie, y Schwemmle, 2016; Freidl et al., 2015; Tong et al., 2012, 2013). Existe suficiente evidencia que apunta a que la participación de distintos grupos de mamíferos silvestres y domésticos que han sido menormente estudiados, representan una fuente importante de reservorios de diferentes subtipos de influenza y que dichos

hospederos pueden estar participando significativamente tanto en la diversificación viral como en la dinámica de transmisión, es por ello que debe incrementarse el monitoreo y estudio de estos vertebrados (Chan et al., 2013; Runstadler et al., 2013).

Murciélagos y su relación con los virus de influenza

En 2012 se identificaron secciones importantes de secuencias del virus de influenza A, mediante la secuenciación y análisis de productos PCR de muestras de hisopado rectal obtenidas de murciélagos en dos estudios diferentes, realizados en Guatemala y Perú, respectivamente (Tong et al., 2012, 2013). Los análisis filogenéticos demostraron que las secuencias correspondientes a los virus de influenza detectados en murciélagos son altamente divergentes con relación a la diversidad viral reconocida hasta ese momento, aunque estos análisis evidenciaron que la mayor parte de los segmentos genómicos se encuentran estrechamente relacionados con los virus de influenza A en mayor medida que con los virus de influenza B y C (Wu, Wu, Tefsen, Shi, y Gao, 2014).

Con base en el alto grado de divergencia de dichas secuencias, los dos virus detectados en los murciélagos se clasificaron como subtipos completamente distintos y se denominaron como nuevos subtipos, H17N10 en Guatemala y H18N11 en Perú (Tong et al., 2012, 2013). Complementariamente, un estudio recientemente publicado, mostró la presencia de H18N11 en dos murciélagos en Brasil (Campos et al., 2019) (cuadro 2).

Además, también se han realizado pruebas serológicas que indican que los subtipos H17 y H18 circulan dentro de varias poblaciones de distintas especies de murciélagos neotropicales que se distribuyen en América Central y América del Sur. Estas especies incluyen a *Sturnira sp.*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Myotis sp.*, *Molossus molossus*, entre otras (Tong et al., 2013) (cuadro 2). Si bien el grupo taxonómico de los murciélagos ha sido intensamente monitoreado en busca de material genético compatible con distintas familias virales (O'Shea et al., 2014), los estudios orientados hacia la detección de virus de influenza son recientes y relativamente escasos. Por lo que actualmente no está claro si estos virus pueden llegar a encontrarse fuera del continente americano. Sin embargo, se ha reportado evidencia serológica en *Rousettus leshenaultii* en la India, H9 en *Eidolon helvum* en Ghana y H3 en *Nyctalus noctula* en Kazajistán (Brunotte et al., 2016; Freidl et al., 2015).

Cuadro 2. Especies de murciélagos positivas en la prueba de ELISA y PCR a H17 y H18 en Guatemala, Perú y Brasil.

Especie	Subtipo	País
+ <i>Artibeus jamaicensis</i>	H17	Guatemala
+ <i>Artibeus lituratus</i>	H17/H18	Guatemala/Perú/Brasil**
<i>Artibeus obscurus</i>	H18	Perú
<i>Artibeus planirostris</i>	H18*	Perú
<i>Carollia brevicauda</i>	H18	Perú
+ <i>Carollia perspicillata</i>	H17/H18	Guatemala/Perú
<i>Desmodus rotundus</i>	H17/H18	Guatemala/Perú
+ <i>Glossophaga soricina</i>	H17	Guatemala
<i>Macrophyllum macrophyllum</i>	H17	Guatemala
<i>Molossus molossus</i>	H18	Perú
<i>Myotis sp.</i>	H18	Perú
+ <i>Phyllostomus discolor</i>	H17/H18	Guatemala/Perú
<i>Phyllostomus hastatus</i>	H18	Perú
<i>Platyrrhinus bidens</i>	H18	Perú
<i>Rhinophyla pumilio</i>	H18	Perú
+ <i>Sturnira lilium</i>	H17*	Guatemala
<i>Vampyressa bidens</i>	H18	Perú

*Positivo a serología y a PCR

** Positivo a PCR

Las especies con un signo de + fueron capturadas en el presente estudio

La posibilidad de que estos linajes de influenza recientemente detectados en murciélagos puedan representar un riesgo para la población humana como una enfermedad zoonótica hasta la fecha no se ha podido determinar, ya que los esfuerzos por aislar los virus no han sido exitosos. Esto podría estar relacionado con las proteínas de superficie atípicas de estos virus, especialmente porque no hay pruebas de que las líneas celulares utilizadas para el aislamiento del virus expresen los receptores que permitan la absorción de las partículas virales (Juozapaitis et al., 2014; Tong et al., 2012, 2013; Zhou et al., 2014).

En un estudio reciente, se generaron virus quiméricos de H17N10 y H18N11 de murciélago. Sin embargo, debido a que las glicoproteínas de superficie de los virus de murciélago (HA y NA) carecían de las características canónicas normalmente asociadas a estas proteínas se propuso nombrar a estos virus como HL17 y HL18 (HA-like) y NL10 y NL11 (NA-like). Estos virus quiméricos fueron generados en células de mamíferos los cuales contenían seis genes internos del virus HL17NL10 o HL18NL11 de influenza A, con los dos genes de superficie restantes que codifican HA y NA de el virus de influenza H7N7. En este estudio se explicó que, para un crecimiento eficiente del virus quimérico de murciélago en células de mamíferos o ratones, no se requieren mutaciones adaptativas. Sin embargo, la replicación viral y la patogenicidad en ratones depende en cierta medida de la combinación de HA/NA (Juozapaitis et al., 2014; Zhou et al., 2014). Además, un informe reciente mostró que la proteína no estructural 1 (NS1) de ambos virus de murciélago es capaz de bloquear eficazmente la respuesta inmune innata en células humanas (Turkington et al., 2015).

Por otra parte, algunos estudios demostraron que líneas celulares de las especies de murciélagos *Ptoropus alecto*, *Rousettus aegyptiacus*, *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops buettikoferi*, *Rhinolophus alcyone*, *Carollia perspicillata* y *Tadarida brasiliensis* son susceptibles de ser infectadas con el virus de influenza aviar y humano. Este hallazgo aunado a una reciente publicación en la cual se reportó la presencia de receptores de ácido siálico (α 2,3-SA- α 2,6-SA) en murciélagos de la especie *Sturnira lilium* sugiere que las infecciones causadas por virus de influenza en murciélagos podrían ocurrir de manera natural, propiciando la recombinación

genética con diferentes subtipos virales y dando como resultado la aparición de nuevas cepas del virus de influenza con un gran potencial patógeno (Chothe et al., 2017; Dlugolenski et al., 2013; Hoffmann et al., 2013; Poole et al., 2014).

La descripción de dos nuevos linajes del virus de influenza A no representa suficiente información que permita reconocer el origen de estos virus en las poblaciones de murciélagos. Sin embargo, a través de análisis funcionales, moleculares y filogenéticos, Tong y colaboradores concluyeron que las estructuras de estos dos virus H18N11 (Perú) y H17N10 (Guatemala) comparten ancestros comunes (Tong et al., 2013). Las estructuras de HA están más estrechamente relacionadas con las HAs de los virus de influenza clásicos (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16), pero la proteína NA es totalmente divergente de las estructuras de las demás NAs conocidas (Wu et al., 2014). Finalmente, se ha propuesto que estudios futuros podrían revelar nuevos mecanismos de las proteínas NS1s reconocidas por modular a la célula hospedera de los murciélagos, de la misma manera, también se podría descubrir las formas en que esta proteína ha funcionado y evolucionado en los antiguos hospederos (Turkington et al., 2015). Se sabe que los quirópteros representan uno de los grupos biológicamente más diversos de mamíferos del mundo, con más de 1240 especies reconocidas (Tudge 2000, Wilson y Reeder 2005). Este número representa aproximadamente el 25% de todos los mamíferos conocidos, solamente siendo superado por los roedores en cuanto a número de especies. México es el sexto país a nivel mundial en cuanto a número de especies se refiere, cuenta con 138 especies de murciélagos reportadas en el territorio (Medellín et al., 1997). La gran diversidad de murciélagos distribuida

en el territorio nacional puede ser explicada en parte por la posición en la cual se encuentra el país, la cual abarca dos grandes regiones biogeográficas, la Neártica y la Neotropical (Ortega, Arita, y Arita, 1998). Además, la gran variedad de climas y procesos ecológicos desempeñan un papel fundamental en la gran diversidad mexicana. Sin embargo, en las últimas décadas las actividades humanas han propiciado la reducción de la vegetación natural y el cambio en el uso de suelo, generando nuevos ambientes en los cuales se favorece la interacción entre fauna silvestre y animales domésticos. Es destacable que estas interacciones se asocian con un importante incremento en el potencial de transmisión de patógenos previamente desconocidos hacia los animales de producción y a la población humana (Jones, 2013).

En el caso del virus de influenza, se reconoce ampliamente el riesgo de transmisión debido a la gran capacidad que el virus desarrolla para infectar múltiples especies hospederas. La reciente circulación de nuevos subtipos de influenza en murciélagos de Centroamérica y Sudamérica, aunado a las características biológicas, ecológicas, evolutivas e inmunológicas que poseen los quirópteros pone en evidencia la importancia de monitorear a estos mamíferos. Sin embargo, no existe información sobre la circulación del virus de influenza en los quirópteros de México, por lo tanto, es necesaria la exploración de las poblaciones de murciélagos distribuidas en el país mediante la toma de muestras para realizar tanto pruebas moleculares como serológicas a fin de generar dicha información.

Justificación

Debido a la distribución de su gran biodiversidad, densidad y expansión de su población humana, México se considera una zona de riesgo para la transmisión de enfermedades infecciosas emergentes de origen zoonótico (Morse, 2012). Este hecho se ha podido confirmar a través de la detección de brotes recientes de enfermedades en poblaciones humanas y animales domésticos, como el virus de influenza H1N1 en el 2009 (Mann, 2013; Zepeda-Lopez, 2010). Dado el gran impacto que generan los virus de influenza en distintos sectores como la salud pública, la producción animal y la economía nacional, aunado a la reciente identificación de subtipos virales altamente divergentes en murciélagos de Centroamérica y Sudamérica, es necesario ampliar el conocimiento actual de la interacción entre murciélagos y el virus de influenza en México. Es por ello, que este estudio plantea como objetivo general identificar la presencia del virus de Influenza mediante técnicas moleculares y serológicas en comunidades de murciélagos en los estados de Morelos, Chiapas y Veracruz.

Hipótesis

La alta diversidad de especies de murciélagos que se distribuyen en México alberga una diversidad de virus de influenza no descrita en la actualidad.

Objetivo general

Determinar con métodos moleculares y serológicos la presencia del virus de influenza en murciélagos ubicados en los Estados de Morelos, Chiapas y Veracruz.

Objetivos específicos

- Obtener muestras a partir de distintas especies de murciélagos de Morelos, Chiapas y Veracruz.
- Evaluar la presencia de virus de influenza en distintas especies de murciélagos mediante qRT-PCR.
- Identificar la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza en sueros de murciélagos mediante ELISA.

Metodología

Área de estudio

Se seleccionaron tres áreas de estudio (cuadro 3). La primera ubicada en la zona centro del territorio mexicano, específicamente en la Reserva de la Biosfera de Quilamula, Morelos (figura 3). Esta reserva se encuentra en la zona de transición entre dos grandes regiones biogeográficas importantes, la Neotropical y la Neártica. Esta característica propicia que la reserva sea un espacio donde se distribuye una gran diversidad de especies residentes, migratorias, endémicas y otras ampliamente distribuidas con afinidad tanto boreal como tropical (Escalante, Linaje, Gamez, Rodriguez, & Morrone, 2012; Marshall & Liebherr, 2000). La segunda se encuentra situada en el sureste del país en el Estado de Chiapas, donde se localiza la Selva Lacandona (figura 4), ésta abarca aproximadamente 1.5 millones de hectáreas, siendo principalmente cubierta por bosque tropical lluvioso (Medellín et al., 1997). El área boscosa de la selva se ha reducido dramáticamente en cerca de dos tercios en los últimos 40 años, solamente alrededor de 500,000 hectáreas mantienen la vegetación original. Actualmente, la Reserva de la Biósfera de Montes Azules, representa aproximadamente 0,16% del territorio total del país y contiene la mayoría de los remanentes de vegetación nativa de la región. Esta reserva se encuentra situada en la región Neotropical y es reconocida como una de las zonas con mayor diversidad y riqueza de especies de murciélagos en el mundo (Kalko, 1997). El tercer sitio de estudio se encuentra situado en Veracruz, específicamente en la región de Xalapa (figura 5). El sitio está mayormente constituido por vegetación tipo acahual que se entremezcla con zonas de cafetal.

Cuadro 3. Ubicación de las localidades de muestreo a partir de murciélagos capturados.

	Ubicación y sitio de colecta	Longitud	Latitud
Morelos	Presa	-99.0130	18.5157
	Pinta	-99.0149	18.4629
	Encantada	-99.0989	18.4486
Chiapas	Potrero	-90.9258	16.1199
	Estación	-90.9396	16.1154
	Selvita	-90.9037	16.1605
	Mariposario	-90.8993	16.1564
Veracruz	Cafetal	-96.9976	19.4627

Cuadro 4. Fechas de muestreo por sitio

Estado	Ubicación y sitio de colecta	Fechas de muestreo
Morelos	Presa	<ul style="list-style-type: none">• 13 junio 2017
	Encantada	<ul style="list-style-type: none">• 14 junio 2017
	Pinta	<ul style="list-style-type: none">• 15 junio 2017
Chiapas	Potrero	<ul style="list-style-type: none">• 7-9 diciembre 2016• 28 febrero 2017• 20 junio 2017
	Estación	<ul style="list-style-type: none">• 10 diciembre 2016• 21 junio 2017
	Selvita	<ul style="list-style-type: none">• 2 marzo 2017• 22 junio 2017
	Mariposario	<ul style="list-style-type: none">• 1 marzo 2017• 23 junio 2017
Veracruz	Cafetal	<ul style="list-style-type: none">• Abril 2018

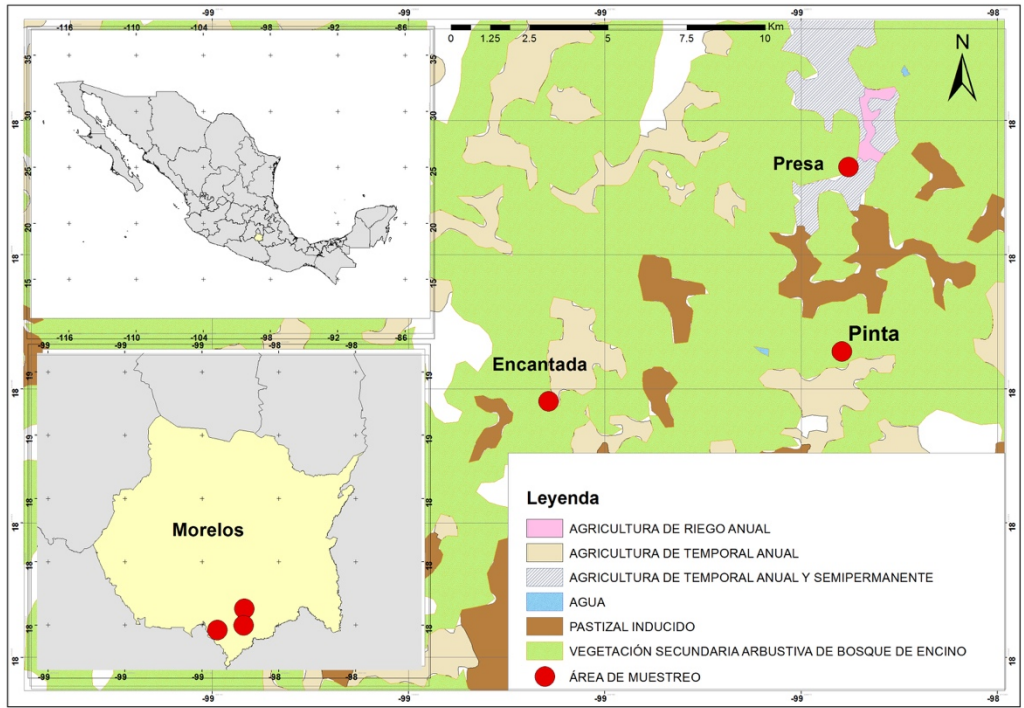


Figura 3. Mapa del área de estudio de la Reserva de la Biósfera de Quilamula, Morelos.



Figura 4. Mapa del área de estudio de la Reserva de Biósfera de Montes Azules, Chiapas.

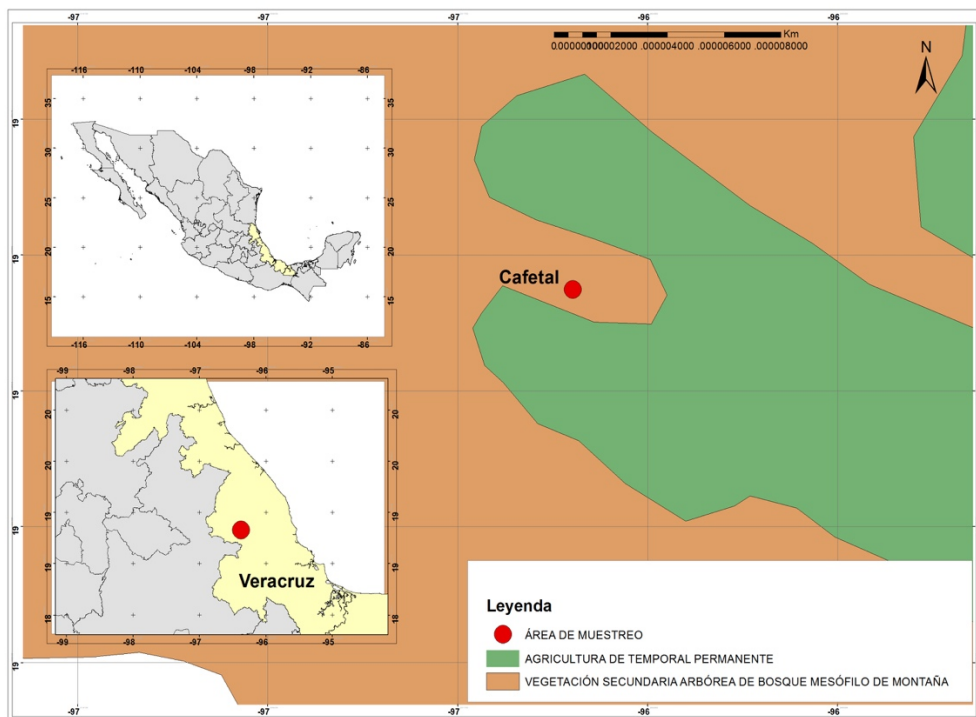


Figura 5. Mapa del área de estudio de Veracruz.

Diseño de estudio, captura y toma de muestras

La captura de murciélagos y obtención de muestras se realizó a través de un total de ocho salidas de campo durante el periodo comprendido entre diciembre del 2016 y abril 2018 (cuadro 4). Se seleccionaron los sitios de muestro con base en la literatura y muestreos realizados anteriormente. En total se identificaron ocho puntos potenciales para el monitoreo. Estos se ubican en los Estados de Morelos, Chiapas y Veracruz (cuadro 4). Cabe señalar que en la Reserva de la Biósfera de Quilamula los puntos de captura se localizaron dentro de un área conservada y fueron seleccionados bajo criterios de tipo logístico (accesibilidad, seguridad y permisos). En la Reserva de la Biósfera de Montes Azules, Chiapas se seleccionaron puntos de captura previamente monitoreados, ubicados tanto en áreas conservadas como perturbadas.

En cada punto de colecta se identificó según el caso, la salida de los animales de sus respectivos sitios de refugio o zonas de paso de murciélagos. Al atardecer se colocaron redes de niebla para las zonas de forrajeo o una trampa tipo arpa para el caso de cuevas. El esfuerzo de muestreo fue variable y dependió de las características de cada punto de colecta. En general se colocaron 4 redes de niebla (9 metros de largo por 3 metros de alto) durante cuatro horas a partir del crepúsculo. Los murciélagos capturados fueron colocados en sacos de tela individuales, previo a la identificación, la obtención de datos morfométricos y muestras biológicas. Cada individuo capturado fue identificado taxonómicamente mediante claves de campo (Medellín et al., 1997). Se registró género, especie, edad, sexo, peso y algunas medidas morfométricas. Los individuos fueron liberados en el mismo sitio de captura

una vez que se colectó la información y se obtuvieron las muestras biológicas necesarias. Los procedimientos de captura y manejo de animales fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA), FMVZ, UNAM, incluir el código de aprobación.

A cada individuo se le tomaron dos muestras; una muestra sanguínea obtenida punzando con una aguja de 25G X 16mm la vena radial. La sangre obtenida se almacenó en tiras de papel filtro *nobuto* con una capacidad de 40 microlitros de almacenamiento; y una muestra de hisopado rectal que fue depositada en microtubos de 1.5 ml estériles con 1ml de medio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*). Las muestras obtenidas a partir de hisopados fueron almacenadas en nitrógeno líquido y las muestras obtenidas con las tiras de papel filtro *nobuto* fueron almacenadas en sobres de papel. Finalmente, todas las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una Salud en la FMVZ donde se almacenaron para su posterior procesamiento.

Detección molecular

Extracción de ácidos nucleicos

Las muestras correspondientes a los hisopados rectales se descongelaron y fueron centrifugadas a 2500 rpm durante un minuto con el propósito de homogenizar la muestra y sedimentar los detritos. En el Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una Salud en la FMVZ se obtuvieron 100 microlitros del sobrenadante de cada muestra para realizar conglomerados de dos a cinco muestras procedentes de murciélagos

“compatibles”, considerando la fecha, sitio de colecta, especie y sexo. Algunas muestras se procesaron de manera individual, por lo cual se obtuvieron 200 microlitros. Todos los conglomerados fueron mantenidos en congelación. Cada conglomerado fue procesado utilizando el *kit* comercial de extracción y purificación automatizada de ARN viral (*Cador pathogen 96 QIAcube HT Kit* de Qiagen). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de la Unidad de Investigación de la FMVZ en los equipos automatizados *QIAcube HT* y *QIAgility* de Qiagen.

RT-PCR en Tiempo Real

A fin de determinar la presencia de material viral, se utilizó el método de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR) para realizar la amplificación del ácido nucleico viral. Se utilizó el *kit* comercial (*Swine Influenza Virus RNA Test Kit, VetMAX-Gold SIV Detection Kit*), que tiene como blanco de amplificación un fragmento (longitud, pb) del gen M o gen de matriz del virus de influenza, que es un gen conservado útil para la detección de los subtipos H1 al H18 del virus. Este *kit* reporta una sensibilidad de 98% y una especificidad de 99%. El *kit* incluye controles positivo, interno y negativo (NTC), *buffer*, enzimas e iniciadores. El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó el termociclador *Rotor-Gen e Q* de *Qiagen* para la amplificación de ADN. Los ajustes y condiciones de amplificación se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Condiciones de amplificación de un fragmento del gen de matriz del virus de influenza por qRT-PCR.

Fase	Ciclo	Temperatura	Tiempo
Transcripción Reversa	1	48°C	10 min.
Inactivación RT/desnaturalización inicial	1	95°C	10 min.
Amplificación	40	95°C 60°C	15 seg. 45 seg.

Siguiendo las instrucciones del *kit*, las muestras con un valor de Ct menor a 38 se consideraron como positivas, mientras que las muestras con valores de Ct entre 38 y 40 se consideraron sospechosas y se repitieron de manera individual. Los valores de Ct no detectados se consideraron como negativos. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado mediante qRT-PCR.

Detección serológica

Preparación de sueros

Las tiras de papel filtro *nobuto* que contenían las muestras de sangre, se hidrataron en 500ul de PBS (Phosphate buffered Saline) y se incubaron por 24 horas a 4°C. Posteriormente, se retiraron y se incubaron 30 minutos a 60°C (Vigueras Galvan, 2014).

Análisis serológico

El diagnóstico serológico se realizó en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Se evaluaron 348 muestras mediante la técnica de ELISA. Se sensibilizó la placa (de la marca Brand) de 96 pozos con virus de influenza subtipo H7 en amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio 0.1M y bicarbonato de sodio 0.1M, pH 9.6), se incubó 16 horas a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con solución de lavado (cloruro de sodio 125mM, 25mM Tris-HCl pH7.9, Tween -20 0.1%), se agregó la solución de bloqueo (leche descremada 5% en solución de lavado) y se incubó una hora a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron tres lavados y se agregó el suero problema en una dilución 1:50 en solución de bloqueo incubando nuevamente por una hora a 37°C. Se repitieron los lavados y se agregó la Proteína G (Sigma P817) como segundo anticuerpo a una dilución 1:10,000 en PBS con 0.1% de gelatina y se incubó por una hora a 37°C. Finalmente, se repitieron los lavados y se reveló con Tetrametilbenzidina (TMBss Sigma T4444) incubando 10 minutos y posteriormente frenando con ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron a 450nm en un espectrofotómetro *Epoch Biotek*.

La muestra se consideró positiva si el valor de densidad óptica fue mayor de 0.4. El valor de corte fue establecido basado en la relación entre la reactividad de sueros problemas, controles positivos y negativos (*Valor SP*) (Jolaoluwa Awosanya, Ogundipe, Babalobi, & Omilabu, 2013).

$$\text{Valor SP} = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra} - \text{Densidad óptica del control negativo}}{\text{Densidad óptica del control positivo} - \text{Densidad óptica del control negativo}}$$

El valor SP se emplea como punto de corte para asignar a una muestra como positiva o negativa. El valor SP que se recomienda es 0.4. Muestras por arriba de este valor son consideradas como positivas; muestras por debajo de este valor se califican como negativas (cuadro 6) (Jolaoluwa Awosanya, Ogundipe, Babalobi, y Omilabu, 2013; OPS, 2010; Piñeyro et al., 2010).

Resultados

Capturas por escala regional

Considerando las ocho localidades de este estudio, se capturó un total de 413 murciélagos. Los individuos capturados representaron seis familias, correspondientes a 25 géneros y 35 especies diferentes (figura 6 y anexo 1).

Figura 6. Abundancia total de especies capturadas.

Figura 6. Abundancia total de especies de murciélagos capturados en los Estados de Chiapas, Morelos y Veracruz.

Riqueza específica: en total se registró una riqueza de 35 especies. En Chiapas la riqueza de captura fue de 28 especies, que fue el valor máximo, mientras que en Veracruz y Morelos se registraron valores de riqueza de una y ocho especies, respectivamente.

Abundancia relativa: de acuerdo con los datos de captura, la familia con el mayor número de especies capturadas fue Phyllostomidae (25 especies), seguida de la familia Mormoopidae (4 especies), Vespertilionidae (3 especies), Molossidae (2 especies) y finalmente, las familias Natalidae y Emballonuridae con una especie, respectivamente. La especie más abundante fue *Artibeus lituratus* (64 individuos), mientras que para varias especies se registraron abundancias bajas (1 individuo).

Escala local

La localidad que registró la mayor riqueza fue el Mariposario (Chiapas) con 16 especies (48 individuos), mientras que los sitios catalogados como La presa (Morelos) y Cafetal (Veracruz) presentaron la menor riqueza con 1 especie (45 individuos) (figura 7).

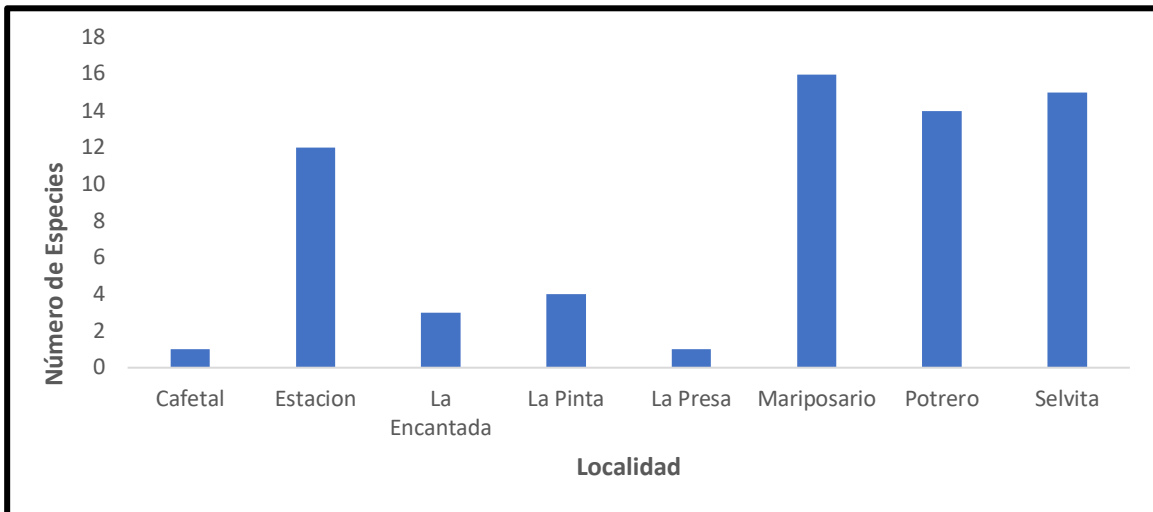


Figura 7. Riqueza de especies de murciélagos de 8 localidades de los Estados de Chiapas, Morelos y Veracruz.

Abundancia relativa: la especie más abundante fue *Artibeus lituratus* en las localidades del Mariposario y Potrero, *Carollia sowelli* en Selvita, en la Pinta *Pteronotus parnelli*, en la Estación *Choeroniscus godmani* y *Pteronotus parnelli*, *Myotis velifer* en la Encantada, mientras que en el Cafetal y la Presa solo se registró una especie, *Sturnira sp.* y *Balanopteryx plicata*, respectivamente (figura 8).

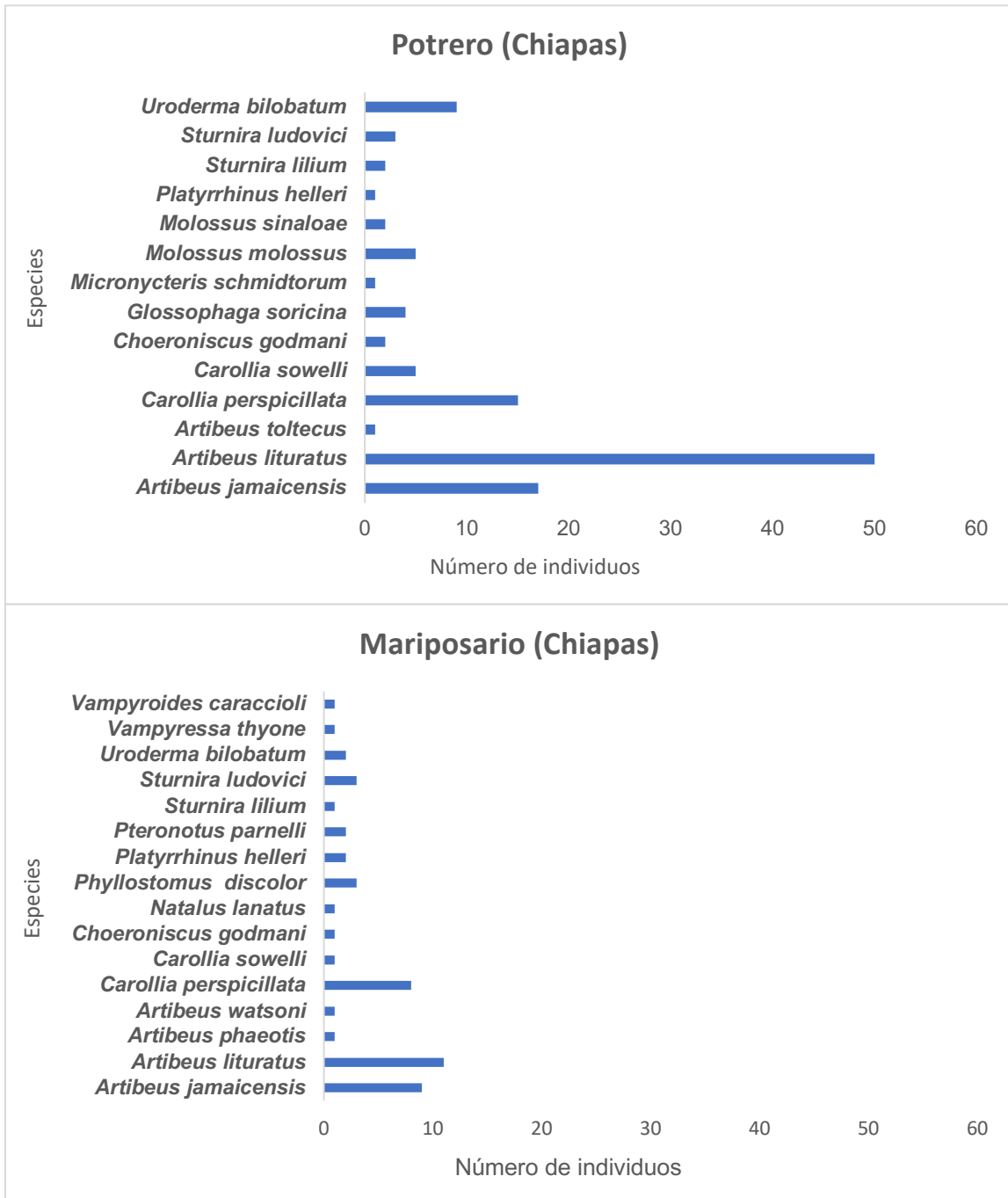


Figura 8a. Composición de especies de murciélagos por localidad del Estado de Chiapas.

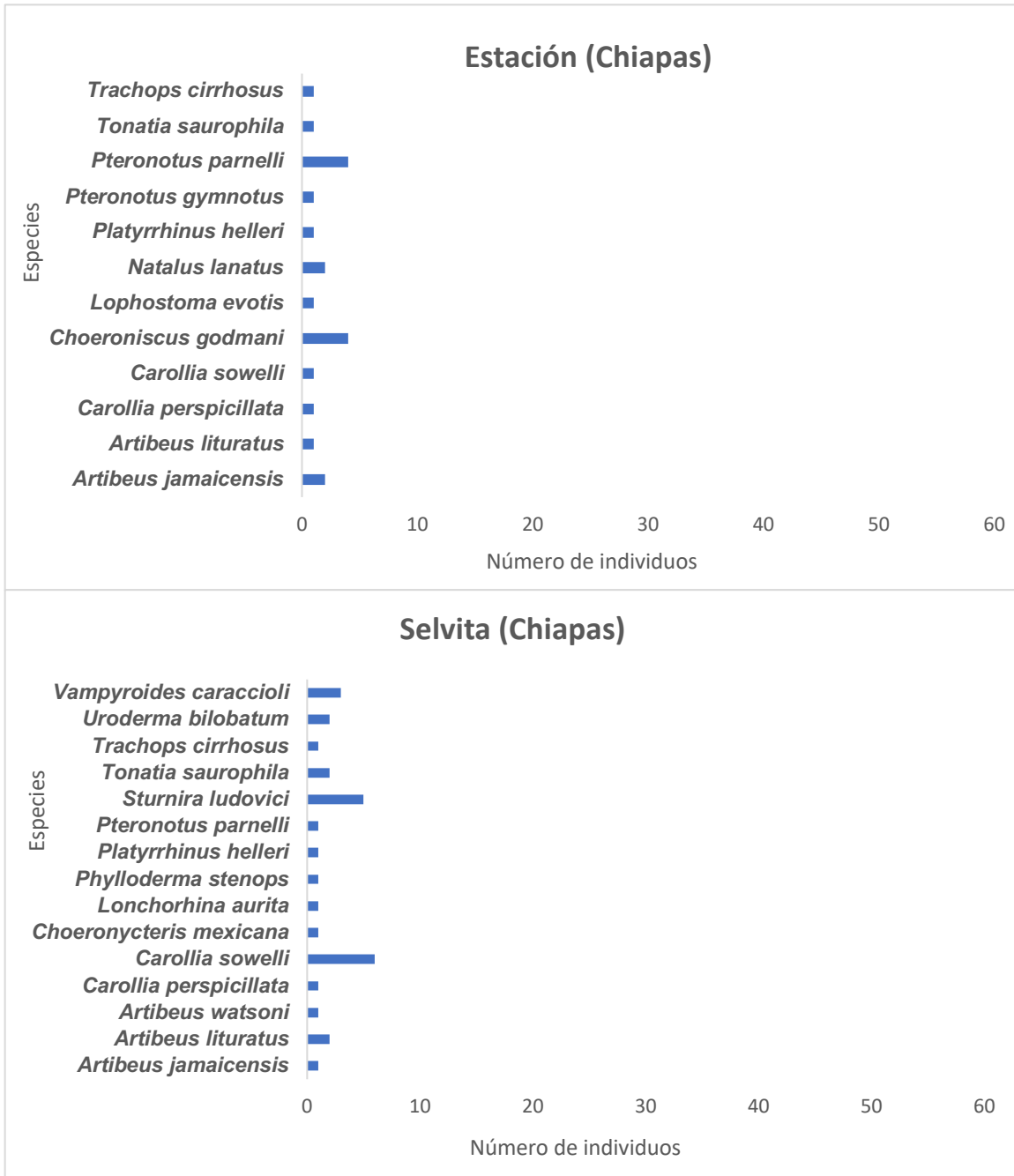


Figura 8b. Composición de especies de murciélagos por localidad del Estado de Chiapas.

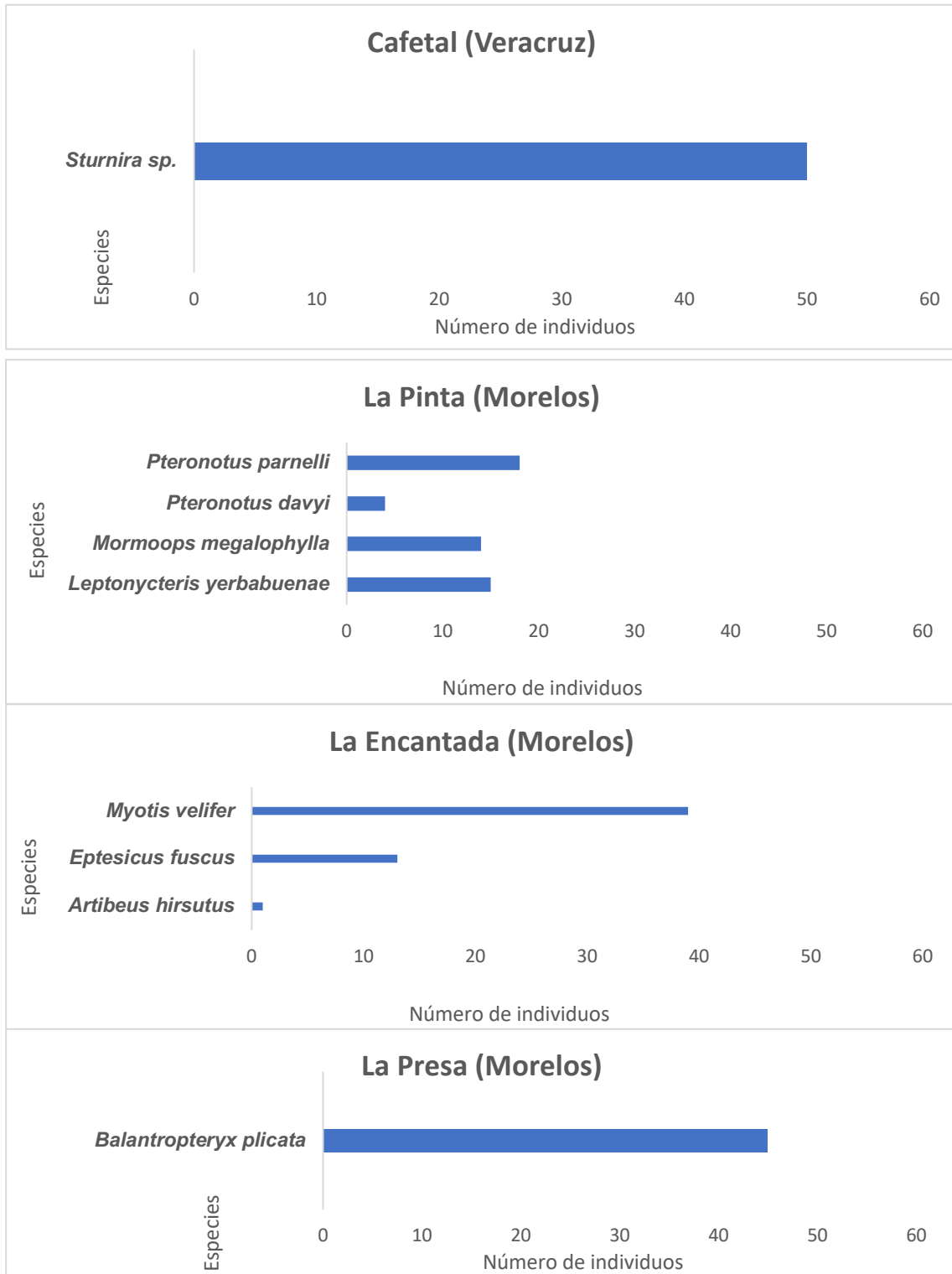


Figura 8c. Composición de especies de murciélagos por localidad de los Estados de Morelos y Veracruz.

Detección molecular

Se analizaron un total de 101 conglomerados de muestras de hisopados rectales correspondientes a 363 murciélagos de 35 especies diferentes. Las qRT-PCR se realizaron por duplicado y se obtuvieron resultados negativos (figura 9) (anexo 2).

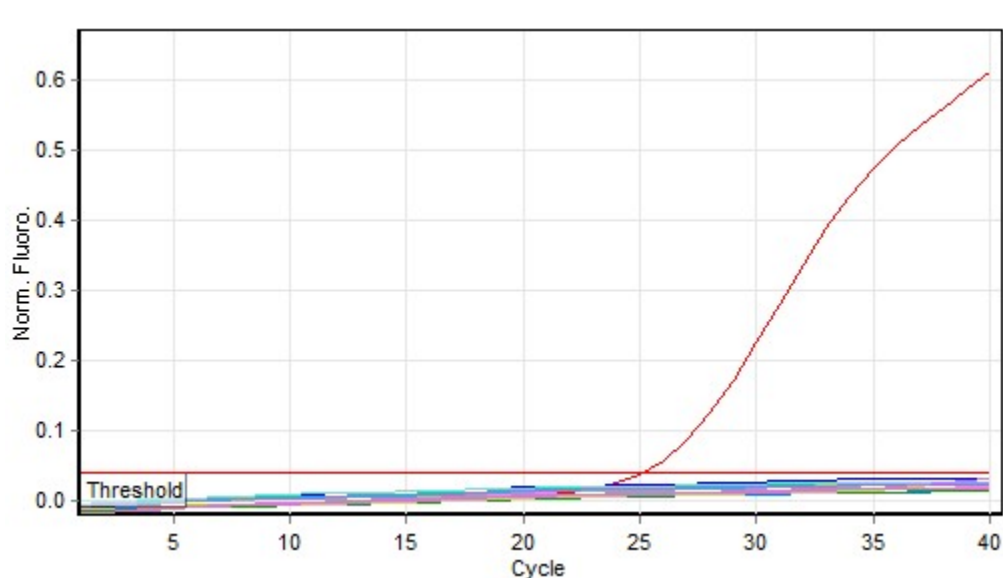


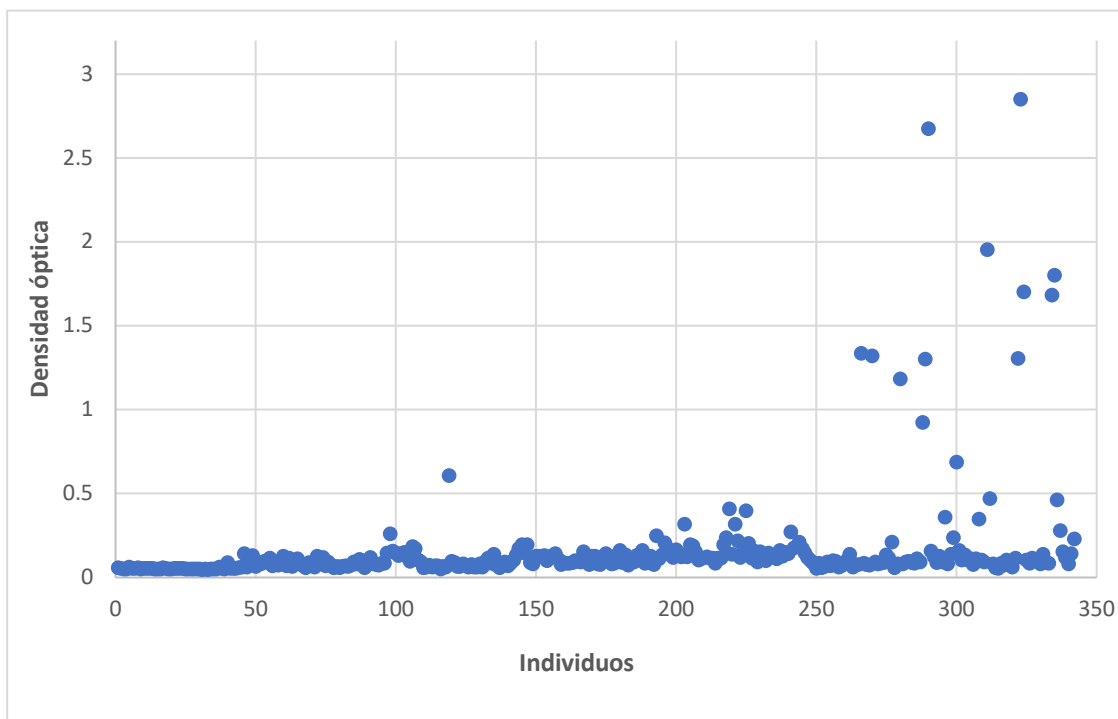
Figura 9. Gráfica de RT-PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen de matriz del virus de influenza a partir de muestras de hisopados rectales obtenidas de murciélagos.

Análisis serológico

Se analizó un total de 342 muestras de suero correspondientes a 345 individuos de 33 especies distintas de murciélagos. Con base en las densidades ópticas se obtuvieron los valores *SP* (figura 10 y 11), se determinó una prevalencia de anticuerpos contra influenza del 3.8% (13 muestras positivas). Las 13 muestras que resultaron positivas corresponden a murciélagos de la familia Phyllostomidae, de las cuales siete pertenecen a *Sturnira sp.*, dos a la especie *Sturnira ludovici*, dos a

la especie *Carollia perspicillata*, una a *Carollia Sowellii* y una a la especie *Pteronotus parnelli* (cuadro 7).

Figura 10. Densidades ópticas de las muestras de murciélagos.



Cuadro 6. Interpretación de la prueba de ELISA.

Valor SP	Interpretación
≤ 0.40	Negativo (sin anticuerpos)
> 0.40	Positivo (con anticuerpos)

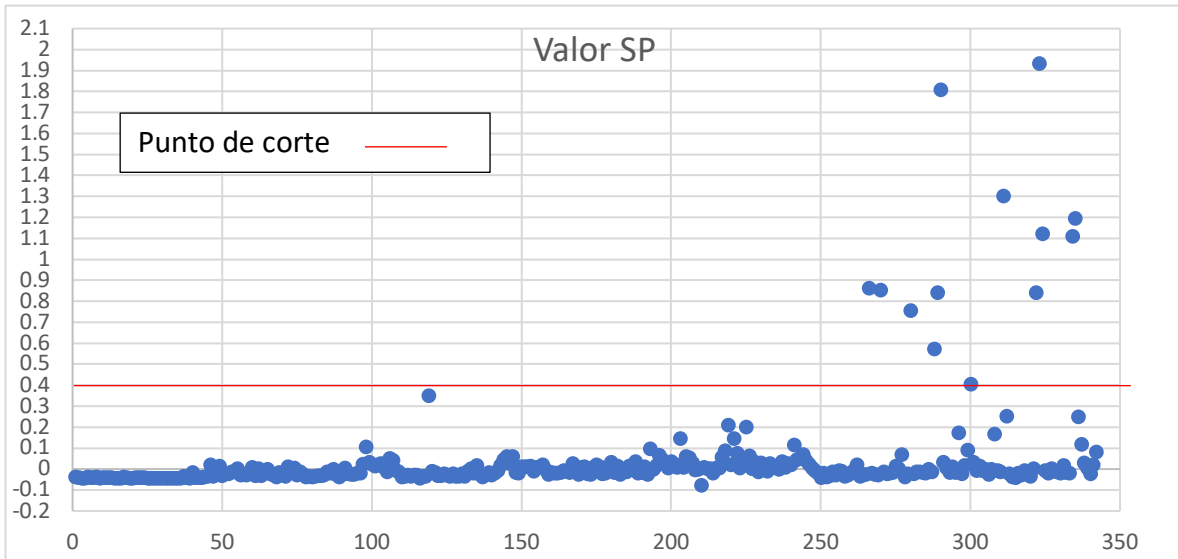


Figura 11. Valores *SP* de muestras de sueros de murciélagos evaluados con la técnica de ELISA que identifica anticuerpos contra la proteína H7 del virus de influenza.

Cuadro 7. Murciélagos seropositivos al virus de influenza H7 en la técnica de ELISA, mostrando la especie y Estado de origen.

Especies	Familia	Estado	Sitio	Año
<i>Sturnira sp.</i>	Phyllostomidae	Veracruz	Cafetal	2018
<i>Sturnira sp.</i>	Phyllostomidae	Veracruz	Cafetal	2018
<i>Sturnira sp.</i>	Phyllostomidae	Veracruz	Cafetal	2018
<i>Sturnira sp.</i>	Phyllostomidae	Veracruz	Cafetal	2018
<i>Sturnira sp.</i>	Phyllostomidae	Veracruz	Cafetal	2018
<i>Sturnira sp.</i>	Phyllostomidae	Veracruz	Cafetal	2018
<i>Sturnira sp.</i>	Phyllostomidae	Veracruz	Cafetal	2018
<i>Sturnira ludovici</i>	Phyllostomidae	Chiapas	Selvita	2017
<i>Sturnira ludovici</i>	Phyllostomidae	Chiapas	Selvita	2017
<i>Pteronotus parnelli</i>	Mormoopidae	Chiapas	Mariposario	2017
<i>Carollia perspicillata</i>	Phyllostomidae	Chiapas	Mariposario	2017
<i>Carollia sowelli</i>	Phyllostomidae	Chiapas	Mariposario	2017
<i>Carollia sowelli</i>	Phyllostomidae	Chiapas	Selvita	2017

Discusión

En el presente estudio se analizaron un total de 413 muestras de 35 especies de murciélagos mediante pruebas moleculares y serológicas, con la finalidad de identificar la circulación del virus de influenza en murciélagos que se distribuyen en Chiapas, Morelos y Veracruz. No se detectó evidencia molecular mediante qRT-PCR. Sin embargo, se detectó la presencia de anticuerpos en trece quirópteros, siete del género *Sturnira sp.* en el Estado de Veracruz, dos en la especie *Sturnira ludovici*, dos en *Carollia perspicillata*, una muestra de *Carollia sowelli* y una en *Pteronotus parnelli* en el Estado de Chiapas.

El desarrollo de técnicas serológicas ha permitido identificar y caracterizar una gran cantidad de virus que circulan en las poblaciones de fauna silvestre, además de que estas técnicas han ayudado al diagnóstico y vigilancia epidemiológica de algunas enfermedades infecciosas emergentes (He et al., 2013; Smith y Wang, 2013). En este sentido una de las pruebas más utilizadas para la detección de anticuerpos contra influenza es el ensayo de ELISA, el cual fue empleado en estudios previos para la detección de H17N10 y H18N11 en murciélagos de Guatemala y Perú, respectivamente (Tong et al., 2012, 2013). Con la prueba de ELISA que se realizó en este estudio se analizaron un total de 342 muestras de las cuales se detectó la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza en siete individuos (2.63%) del género *Sturnira*, tres del género *Carollia* (0.87%) y uno del género *Pteronotus* (0.29%). Se obtuvo una prevalencia general de 3.8% (13/342), siendo baja en comparación a las reportadas en Guatemala 38% (86/228) y Perú 50% (55/110)

(Tong et al., 2012, 2013). En Guatemala la especie *Sturnira liliium* representó el 14.9% de la prevalencia total mientras que el género *Carollia* el 1.30%. En Perú el género *Carollia* obtuvo un 0.9% de la prevalencia general y *Sturnira* no resultó positivo, mientras que el género *Pteronotus* no obtuvo prevalencia en ambos países (Tong et al., 2012, 2013).

Los géneros *Carollia* y *Sturnira* son pertenecientes a la familia *Phyllostomidae*, estos presentan un comportamiento gregario y se alimentan generalmente de frutos (Saldaña-Vázquez et al. 2010). Además, se conoce que las especies de estos dos géneros (junto con *Artibeus*) representan a las especies más abundantes y mayormente distribuidas en las comunidades neotropicales del continente americano (Medellín, et al 2000; Mello, et al. 2008). Sus características biológicas, ecológicas y distribución geográfica combinada con la seroprevalencia que se ha reportado, nos aportan evidencia de que las especies de estos géneros están expuestas a la infección con el virus de influenza de los subtipos H17N10 y H18N11(Tong et al., 2012, 2013).

Las pruebas de identificación serológica del virus de influenza suelen tener una sensibilidad y especificidad similar para las especies domésticas. En este sentido, se han desarrollado una amplia variedad de *kits* comerciales que facilitan y agilizan la detección del virus y anticuerpos en un corto periodo de tiempo. Debido a la utilidad que han tenido estas técnicas de identificación, la mayoría de los *kits* diagnósticos se comercializan para su uso en muestras procedentes de animales domésticos. Por lo que antes de utilizar un *kit* para muestras obtenidas de animales

silvestres, hay que conocer las características del *kit* y las de la muestra para garantizar el resultado. Por ejemplo, existen *kits* serológicos directos que se basan en la detección de posibles anticuerpos presentes en la muestra mediante la unión con el antígeno de interés. Mientras que, en el caso de las técnicas indirectas, para revelar esta unión, se incorpora un anticuerpo secundario marcado que se unirá al anticuerpo de la muestra. Para que esta unión sea específica, el anticuerpo marcado debe ser específico para las inmunoglobulinas de la especie en cuestión. Este hecho explica porque no resulta viable emplear *kits* comerciales diseñados para animales domésticos en especies silvestres. Por ello, una alternativa es desarrollar una prueba en la que los anticuerpos secundarios sean específicos para los anticuerpos de la especie estudiada, sin embargo esto plantea una dificultad si es que se desea estudiar la serología de un gran número de especies ya que se requeriría un anticuerpo secundario para cada especie lo cual resultaría sumamente laborioso y tal vez incosteable comercialmente, ya que tendría un mercado muy restringido.

Los estudios realizados en Guatemala y Perú para la detección de anticuerpos contra de H17N10 y H18N11 respectivamente, emplearon la prueba de ELISA con antígenos recombinantes desarrollados de las secuencias que obtuvieron mediante la prueba de PCR (Tong et al., 2012, 2013). En este estudio se decidió utilizar como antígeno a la proteína H7 y de la misma manera que los estudios previos se utilizó a la proteína G como segundo anticuerpo. Posiblemente, la baja prevalencia en este estudio se deba a que no se empleó un antígeno recombinante conocido como es el caso de rH17 y rH18 que al ser estos desarrollados a partir de secuencias virales

encontradas en los murciélagos, se puede creer que existiera mayor afinidad con los sueros de los quirópteros. Esto podría explicar las altas seroprevalencias reportadas en Guatemala y Perú. La falta en el mercado de un segundo anticuerpo específico para murciélagos es una limitante para realizar la detección de anticuerpos contra el virus de influenza. Por lo que en estudios futuros se recomienda el desarrollo de antígenos y suero anti-murciélago IgG como segundo anticuerpo, específicamente para realizar pruebas de ELISA, lo cual podrá aumentar la sensibilidad y facilitar la detección de anticuerpos contra influenza y otros virus en murciélagos.

Con relación al muestreo, en este estudio se identificaron 35 especies con abundancias variables, sin embargo, el mayor número de especies capturadas pertenece a la familia Phyllostomidae (25 especies), la cual está representada aproximadamente con 123 especies descritas. Ésta familia es considerada la más diversa de toda la región neotropical (Fenton et al, 1992) y está representada por especies con una gran variabilidad morfológica, funcional y con afinidad a una gran gama de nichos ecológicos (Ceballos & Olivia, 2005; Feldhamer et al, 2003). Un ejemplo de la gran diversidad de esta familia se ve reflejada en los diferentes gremios tróficos que son resultado de la disponibilidad de alimento en su área de distribución, de tal manera que se pueden encontrar especies frugívoras, nectarívoras, carnívoras, polinívoras, insectívoras y hematófagas (Fenton et al, 1992). Particularmente en este estudio fueron capturadas especies, frugívoras, insectívoras, nectarívoras y carnívoras. Dada la alta diversidad de especies en los sitios de muestreo en el Estado de Chiapas se logró muestrear un relativamente alto

número de especies, pero en muchos casos con valores bajos de abundancia. Además de trabajar en el perfeccionamiento de las técnicas serológicas sería importante aumentar el número de individuos de ciertas especies potenciales, como *Carollia* y *Sturnira* a evaluar en estudios futuros.

En referencia a los sitios de captura, Chiapas fue el Estado con mayor número de individuos colectados (214). De igual manera el Estado de Chiapas presentó la mayor riqueza con 28 especies, mientras que en Morelos fue de 6 y Veracruz 1. Estos resultados son resultado del esfuerzo de muestreo, ya que en el Estado de Chiapas se realizaron 9 muestreos en total, además Chiapas es reconocida como una de las zonas con mayor diversidad y riqueza de especies de murciélagos en el mundo (da Silva, Gaona y Medellín, 2008). En este Estado se muestrearon cuatro localidades diferentes de las cuales dos se encontraban en sitios altamente conservados (Estación y Selvita) y dos en sitios con cierto grado de perturbación (Potrero y Mariposario), aunque cercanos a la Reserva de la Biosfera. En los sitios conservados, Selvita presentó una riqueza de 16 especies siendo la más abundante *Carollia sowelli* (6), mientras que la Estación presentó una riqueza de 12 especies de las cuales las más abundantes fueron *Choeroniscus godmani* (4) y *Pteronotus parnelli* (4). Entre los sitios perturbados el Mariposario presentó una riqueza de 16 especies, mientras que en el potrero fue de 14 especies. En los Estados de Morelos (6) y Veracruz (1) la riqueza de especies fue menor comparada con la de Chiapas (28). En el caso de el Cafetal que es un sitio perturbado ubicado en Veracruz es una zona de plantaciones de café, en el cual solamente se capturó el género *Sturnira* sp. (50). Mientras que en el Estado de Morelos *Balantrapterix plicata* (45) fue la

especie más abundante. Cabe mencionar que siete *Sturnira sp.* del Cafetal, Veracruz presentaron anticuerpos contra influenza, así mismo en sitios conservados (Mariposario) y perturbados (Selvita) del estado de Chiapas se encontraron anticuerpos contra influenza en diferentes especies dos *Sturnira ludovici*, dos *Carollia sowelli*, un *Carollia perspicillata* y un *Pteronotus panelli*. Por lo que las seroprevalencias obtenidas en este estudio podrían deberse a que especies con hábitos gregarios y con mayores tasas de contacto entre individuos, podrían favorecer la exposición de sus poblaciones al virus de influenza ya que estas especies tienden a formar colonias con un alto número de individuos (Medellín et al., 2000; Mello et al., 2008; Plowright et al., 2015; Saldaña-Vázquez et al., 2010).

En este estudio se obtuvo una seroprevalencia contra influenza de 1.7%. sin embargo, no se detectó evidencia molecular. La identificación molecular del virus de influenza depende en gran medida de las condiciones del muestreo, es decir, del tipo de muestra obtenida, así como de su calidad, manejo y almacenamiento. Los estudios previos sobre influenza en Guatemala, Perú y Brasil para la toma de muestras realizaron necropsias para coleccionar muestras representativas de tejidos. Suero, tejidos, órganos, hisopados rectales y orales fueron inmediatamente almacenadas en nitrógeno líquido, posteriormente se enviaron a almacenamiento para su posterior análisis (Campos et al., 2019; Tong et al., 2012, 2013).

Además, la PCR detecta infecciones activas, lo puede ser menos frecuente en las poblaciones. En cambio, la serología detecta animales que fueron expuestos alguna vez en un periodo relativo a la producción de anticuerpos que podría ser varios meses.

No existe un protocolo de toma de muestras para analizar la presencia de influenza en murciélagos. Sin embargo, La CDC (Centers for Disease Control and Prevention) recomienda para aves y cerdos tomar muestras respiratorias, tanto de hisopados faríngeos como nasales (<https://espanol.cdc.gov/enes/flu/avianflu/severe-potential.htm>). No obstante, se ha documentado que los patos silvestres pueden excretar el virus de influenza en promedio durante 11 días vía cloacal, lo cual permite la colección de muestras del tracto digestivo (Hénaux y Samuel, 2013). Por otra parte, los resultados de un estudio realizado en mapaches demostraron que el análisis de RT-PCR utilizando muestras de hisopados rectales no mostró ARN viral detectable desprendido del tracto digestivo, lo cual es consistente con la propuesta de que el virus de influenza es principalmente una enfermedad respiratoria en mamíferos (Hall et al., 2008).

A pesar de que se ha descrito que los mamíferos no excretan el virus de influenza por el tracto digestivo, los trabajos realizados en Sudamérica y Centroamérica con murciélagos concuerdan en la identificación de ARN viral de influenza en muestras de hisopados rectales, tejido de intestino, hígado, pulmón y riñón (Campos et al., 2019; Tong et al., 2012, 2013). Cabe resaltar que las muestras de hisopados orales tomadas en Guatemala no fueron positivas. Estos datos respaldan que existe un proceso infeccioso en los murciélagos y que la positividad de las muestras no fue resultado de ingerir material infectado con ARN viral a través del tracto digestivo (Tong et al., 2012).

La ausencia de resultados positivos obtenidos por medio de qRT-PCR a partir de hisopados rectales de murciélagos en este estudio contrastan con los reportes realizados en Perú, Guatemala y Brasil. Esto podría deberse en gran medida a que no se tomaron muestras de tejidos (intestino, pulmón, hígado y riñón), lo cual podría estar disminuyendo la probabilidad de detección (Campos et al., 2019; Tong et al., 2012, 2013). Además, se ha reportado que realizar conglomerados con las muestras puede llegar a disminuir la oportunidad de detectar virus de influenza debido a la reducción del título viral de la muestra positiva (Ssematimba et al., 2018). Cabe señalar, que los estudios realizados en Sudamérica y Centroamérica detectaron prevalencias menores al 1% en relación al número de muestras analizadas mediante la técnica de PCR, por lo cual se puede suponer que posiblemente las muestras se tomaron cuando los murciélagos no estaban excretando el virus o que no estuvieron expuestos a la infección (Campos et al., 2019; Tong et al., 2012, 2013).

En otras especies se ha observado que la excreción y replicación viral varía en cuanto a duración. En los cerdos este proceso se limita entre cinco y ocho días (Torremorell, Corzo, Morrison, Dee, & Culhane, 2013). Mientras que en patos la excreción viral dura en promedio 11.5 días (Hénaux & Samuel, 2013). La falta de información sobre la excreción del virus de influenza en murciélagos es una limitante para explicar la nula o la baja prevalencia molecular viral en estos mamíferos. Sin embargo, los quirópteros podrían excretar y replicar el virus en periodos de corta duración o similares a los cerdos y aves silvestres. Por lo tanto, la baja o nula prevalencia molecular en este estudio podría explicarse debido a la ausencia de

exposición reciente del virus durante el tiempo de colección de dichas muestras (Jolaoluwa Awosanya et al., 2013).

Los virus de influenza A pueden infectar a diferentes especies de mamíferos. Al respecto se han identificado eventos de *spillover* de varios subtipos de influenza en una gran variedad de especies de mamíferos. Se ha reportado, que la transmisión por lo general se produce por contacto directo o indirecto a través de contaminación ambiental o ingestión de material infectado (Harris et al., 2017). Sin embargo, hasta la fecha no se ha publicado ningún reporte que describa cuáles son los factores que participan en la transmisión del virus de influenza en murciélagos. Se ha sugerido que los virus de influenza detectados en murciélagos podrían tener estrategias ecológicas y evolutivas similares a los virus de influenza de las aves migratorias, particularmente los patos. En este sentido, en estas aves están involucradas infecciones subclínicas con múltiples subtipos virales como resultado de una transmisión fecal-oral eficiente (Tong et al., 2013).

La transmisión del virus de influenza depende de diversos factores como; la excreción viral, el grado de contacto con otras especies que sean hospederas, así como la estabilidad viral en el ambiente. De igual manera, existen factores intrínsecos que los murciélagos poseen, como su sistema inmune que podría desempeñar un papel importante en la transmisión del virus (Munoz et al., 2015). Al respecto se conoce que los quirópteros se distinguen de los demás mamíferos por su capacidad de vuelo y los procesos que participan en la evolución de este rasgo han tenido consecuencias en su longevidad y funcionamiento inmune (Brook y

Dobson, 2015). Por lo que durante varios años, muchos estudios se han dedicado a estudiar como los quirópteros interactúan y controlan las infecciones virales. De los cuales cabe resaltar la caracterización de los genes relacionados a su sistema inmune (Shaw et al., 2012), de su capacidad de controlar la replicación viral en una fase muy temprana a través de mecanismos innatos como los PRRs (Receptores de Reconocimiento de Patrones) que son proteínas que expresan las células del sistema inmune innato para identificar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los receptores que participan en ella (receptores Tipo Toll, TLR) (Beachboar, 2015; Martinon, Mayor, y Tschopp, 2009). Esto representa un primer intento de identificar algunos de los mecanismos inmunológicos que subyacen en la capacidad de interactuar con patógenos sin manifestar signos o infecciones aparentes. Por lo cual, estos estudios darán lugar a una comprensión significativa de la relación entre virus y hospedero, cuyas implicaciones tendrán un impacto en el desarrollo de nuevas terapias para otras especies y la capacidad de predecir eventos de propagación viral.

La evidencia de presencia de los subtipos de influenza H17N10 y H18N11 en Guatemala, Perú y Brasil, aunado a la evidencia serológica reportada en Ghana de H9, Kazakstán de H3 y la descrita en México en este estudio, sugieren que los murciélagos podrían ser hospederos de diferentes subtipos del virus de influenza, además de que podrían infectarse de manera natural (Campos et al., 2019; Freidl et al., 2015; Tong et al., 2012, 2013). Es por ello, que se requiere intensificar el muestreo, análisis y el desarrollo de técnicas de diagnóstico, sobre todo las pruebas

serológicas las cuales facilitarán la detección de anticuerpos contra virus de influenza en murciélagos.

Los resultados negativos en la detección molecular en este estudio no implican la no circulación de los virus de influenza en los murciélagos de México. En este sentido existe la posibilidad de que los murciélagos estén en contacto con el virus pero no estén infectados. En este estudio se evidencia la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza en quirópteros. Dada a la gran diversidad, abundancia y distribución que presentan estos mamíferos, sumado al creciente uso de suelo y fragmentación de sus hábitats, los murciélagos cada vez están más en contacto con especies domésticas reconocidas por su relación con los virus de influenza en el país. Es por ello que es importante y necesario dar continuidad a los esfuerzos de muestreo en los diferentes Estados de la República, para de esta manera incrementar la capacidad de monitorear la presencia y circulación de los virus de influenza en las poblaciones y comunidades de murciélagos de México.

Conclusiones

No se evidenció la presencia de la infección por el virus de influenza mediante la prueba molecular qRT-PCR en muestras de hisopados rectales de murciélagos.

La prueba de ELISA evidenció la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza en siete murciélagos *Sturnira sp.*, dos *Sturnira ludovici*, dos *Carollia sowelli*, un *Carollia perspicillata* y un *Pteronotus parnelli* en los Estados de Veracruz y Chiapas. Esto aporta información sobre la exposición de especies de murciélagos a este virus y sobre su distribución geográfica en territorio mexicano.

Continuar generando nuevas técnicas de detección que nos permitan identificar la diversidad y circulación de Virus de Influenza, así como aumentar los esfuerzos de muestreo en las poblaciones y comunidades de murciélagos de México, resulta fundamental para generar información sobre la diversidad viral, mecanismos de transmisión, rangos de distribución, y otros factores relacionados con la ecología viral, así como los impactos asociados a la influencia antropogénica sobre los sistemas naturales de los que los murciélagos forman parte.

Anexo 1




















Clasificación de las especies de murciélagos capturados.
































Género y especie	Familia	Gremio trófico	Estado de conservación
<i>Artibeus hirsutus</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Artibeus jamaicensis</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Artibeus lituratus</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Artibeus phaeotis</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Artibeus toltecus</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Artibeus watsoni</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Balantiopteryx plicata</i>	<i>Emballonuridae</i>	Insectívoro	LC
<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Carollia sowelli</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Choeroniscus godmani</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Omnívoro	LC
<i>Choeronycteris mexicana</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Nectarívoro	NT
<i>Eptesicus fuscus</i>	<i>Vespertilionidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Glossophaga soricina</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Nectarívoro	LC
<i>Leptonycteris yerbabuenae</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Nectarívoro	NT
<i>Lonchorhina aurita</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Lophostoma evotis</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Micronycteris schmidtorum</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Molossus molossus</i>	<i>Molossidae</i>	Carnívoro	LC
<i>Molossus sinaloae</i>	<i>Molossidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Mormoops megalophylla</i>	<i>Mormoopidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Myotis velifer</i>	<i>Vespertilionidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Natalus lanatus</i>	<i>Natalidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Phylloderma stenops</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro/Insectívoro	LC
<i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Omnívoro	LC
<i>Platyrrhinus helleri</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Pteronotus davyi</i>	<i>Mormoopidae</i>	Insectívoro	LC
<i>Pteronotus gymnotus</i>	<i>Mormoopidae</i>	Insectívoro	EN
<i>Pteronotus parnelli</i>	<i>Mormoopidae</i>	Insectívoro	EN
<i>Sturnira liliium</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Sturnira ludovici</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Tonatia saurophila</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Omnívoro	LC
<i>Trachops cirrhosus</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Carnívoro	LC
<i>Uroderma bilobatum</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Vampyressa thylene</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC
<i>Vampyroides caraccioli</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Frugívoro	LC













Estado de conservación. NT=Casi amenazada, LC=Poca preocupación, EN=Amenazada (<https://www.iucnredlist.org/species/88151904/22060515>).















Anexo 2

































Valores de Ct del control positivo, controles negativos y de las muestras de hisopados rectales de murciélagos (pool 1 al 101) analizadas mediante qRT-PCR.





Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Control Positivo	Control Positivo	25.11	Positivo
	NTC	Control Negativo		Negativo
	Agua Libre de Nucleasas	Control Negativo		Negativo
	Pool 1	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 2	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 3	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 4	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 5	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 6	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 7	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 8	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 9	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 10	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 11	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 12	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 13	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 14	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 15	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 16	Hisopo Rectal		Negativo

Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Control Positivo	Control Positivo	25.11	Positivo
	NTC	Control Negativo		Negativo
	Agua Libre de Nucleasas	Control Negativo		Negativo
	Pool 17	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 18	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 19	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 20	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 21	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 22	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 23	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 24	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 25	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 26	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 27	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 28	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 29	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 30	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 31	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 32	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 33	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 34	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 35	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 36	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 37	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 38	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 39	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 40	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 41	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 42	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 43	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 44	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 45	Hisopo Rectal		Negativo

Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Pool 46	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 47	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 48	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 49	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 50	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 51	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 52	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 53	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 54	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 55	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 56	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 57	Hisopo Rectal		Negativo

Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Control Positivo	Control Positivo	25.24	Positivo
	NTC	Control Negativo		Negativo
	Agua Libre de Nucleasas	Control Negativo		Negativo
	Pool 58	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 59	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 60	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 61	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 62	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 63	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 64	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 65	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 66	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 67	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 68	Hisopo Rectal		Negativo

Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Control Positivo	Control Positivo	25.18	Positivo
	NTC	Control Negativo		Negativo
	Agua Libre de Nucleasas	Control Negativo		Negativo
	Pool 69	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 70	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 71	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 72	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 73	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 74	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 75	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 76	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 77	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 78	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 79	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 80	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 81	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 82	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 83	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 84	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 85	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 86	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 87	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 88	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 89	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 90	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 91	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 92	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 93	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 94	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 95	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 96	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 97	Hisopo Rectal		Negativo

Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Pool 98	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 99	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 100	Hisopo Rectal		Negativo
	Pool 101	Hisopo Rectal		Negativo

Referencias

- Andino, R., & Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology*, 479–480, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.022>
- Beachboard, D. C. (2015). Innate immune evasion strategies of DNA and RNA virus, 14(11), 871–882. <https://doi.org/10.1111/obr.12065>.Variation
- Bengis, R. G., Leighton, F. a, Fischer, J. R., Artois, M., Mörner, T., & Tate, C. M. (2004). The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 23(2), 497–511.
- Brook, C. E., & Dobson, A. P. (2015). Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*, 23(3), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004>
- Brunotte, L., Beer, M., Horie, M., & Schwemmler, M. (2016). Chiropteran influenza viruses: Flu from bats or a relic from the past? *Current Opinion in Virology*, 16, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.02.003>
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 531–545. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
- Campos, A. C. A., Góes, L. G. B., Moreira-Soto, A., de Carvalho, C., Ambar, G., Sander, A.-L., ... Drexler, J. F. (2019). Bat Influenza A (HL18NL11) Virus in Fruit Bats, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 25(2), 333–337. <https://doi.org/10.3201/eid2502.181246>
- Ceballos, G., & Oliva. (2005). *Los mamíferos de México* (Comisión n). México: Fondo de cultura económica.
- Chan, J. F., To, K. K., Tse, H., Jin, D., & Yuen, K. (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses : lessons from bats and birds. *Trends in Microbiology*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.05.005>
- Chan, J. F. W., To, K. K. W., Tse, H., Jin, D. Y., & Yuen, K. Y. (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. *Trends in Microbiology*, 21(10), 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.05.005>
- Cheung, T. K. W., & Poon, L. L. M. (2007). Biology of influenza a virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1102, 1–25.

<https://doi.org/10.1196/annals.1408.001>

- Chothe, S. K., Bhushan, G., Nissly, R. H., Yeh, Y.-T., Brown, J., Turner, G., ... Kuchipudi, S. V. (2017). Avian and human influenza virus compatible sialic acid receptors in little brown bats. *Scientific Reports*, 7, 660. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00793-6>
- da Silva, A. G., Gaona, O., & Medellín, R. A. (2008). Diet and Trophic Structure in a Community of Fruit-Eating Bats in Lacandon Forest, México. *Journal of Mammalogy*, 89(1), 43–49. <https://doi.org/10.1644/06-mamm-a-300.1>
- Daszak, P., Cunningham, a a, & Hyatt, a D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science (New York, N. Y.)*, 287(5452), 443–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642539>
- Daszak, P., Cunningham, a a, & Hyatt, a D. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78(2), 103–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230820>
- De Graaf, M., & Fouchier, R. A. M. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO Journal*, 33(8), 823–841. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387442>
- Dixon, M. a, Dar, O. a, & Heymann, D. L. (2014). Emerging infectious diseases: opportunities at the human-animal-environment interface. *The Veterinary Record*, 174, 546–51. <https://doi.org/10.1136/vr.g3263>
- Dlugolenski, D., Jones, L., Tompkins, S. M., Crameri, G., Wang, L. F., & Tripp, R. a. (2013). Bat cells from *Pteropus alecto* are susceptible to influenza A virus infection and reassortment. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7, 900–903. <https://doi.org/10.1111/irv.12128>
- Dobson, a, & Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1411), 1001–12. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0900>
- Escalante, T., Linaje, M., Gamez, N., Rodriguez, G., & Morrone, J. J. (2012). Caracterización biogeográfica de la Faja Volcánica Transmexicana y análisis de los patrones de distribución de su mastofauna Biogeographic characterization of the Transmexican Volcanic Belt and analysis of the distributional patterns of the mammal fauna. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 83, 258–272.

- Feldhamer, G. A., Thomson, B. C., & Chapman, J. A. (2003). *Wild Mammals of North America Biology, Management and conservation*.
- Fenton, M. B., Acharya, L., Audet, D., Hickey, M., & Merriami, O. (1992). Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica*, *24*, 440–446.
- Fraser, C., Donnelly, C. a, Cauchemez, S., Hanage, W. P., Van Kerkhove, M. D., Hollingsworth, T. D., ... Roth, C. (2009). Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(JUNE), 1557–61. <https://doi.org/10.1126/science.1176062>
- Freidl, G. S., Binger, T., Müller, M. A., De Bruin, E., Van Beek, J., Corman, V. M., ... Koopmans, M. (2015). Serological evidence of influenza a viruses in frugivorous bats from Africa. *PLoS ONE*, *10*, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127035>
- Gortazar, C., Reperant, L. a., Kuiken, T., de la Fuente, J., Boadella, M., Martínez-Lopez, B., ... Mysterud, A. (2014). Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens. *PLoS Pathogens*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004129>
- Hall, J. S., Bentler, K. T., Landolt, G., Elmore, S. A., Minnis, R. B., Campbell, T. A., ... McLean, R. G. (2008). Influenza infection in wild raccoons. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(12), 1842–1848. <https://doi.org/10.3201/eid1412.071371>
- Han, B. a., Kramer, A. M., & Drake, J. M. (2016). Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. *Trends in Parasitology*, *32*, 565–577. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.007>
- Harris, K. a., Freidl, G. S., Munoz, O. S., von Dobschuetz, S., De Nardi, M., Wieland, B., ... Consortium, the F. (2017). Epidemiological Risk Factors for Animal Influenza A Viruses Overcoming Species Barriers. *EcoHealth*, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1244-y>
- Hayman, D. T. S., Bowen, R. a., Cryan, P. M., McCracken, G. F., O’Shea, T. J., Peel, a. J., ... Wood, J. L. N. (2013). Ecology of Zoonotic Infectious Diseases in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Zoonoses and Public Health*, *60*, 2–21. <https://doi.org/10.1111/zph.12000>
- He, B., Li, Z., Yang, F., Zheng, J., Feng, Y., Guo, H., ... Tu, C. (2013). Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. *PLoS ONE*, *8*(4).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061950>

- Hénaux, V., & Samuel, M. D. (2013). Avian Influenza Shedding Patterns in Waterfowl: Implications for Surveillance, Environmental Transmission, and Disease Spread. *Journal of Wildlife Diseases*, *47*(3), 566–578. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.3.566>
- Henritzi, D., Hoffmann, B., Wacheck, S., Pesch, S., Herrler, G., Beer, M., & Harder, T. C. (2019). A newly developed tetraplex real-time RT-PCR for simultaneous screening of influenza virus types A, B, C and D. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, *13*(1), 71–82. <https://doi.org/10.1111/irv.12613>
- Hoffmann, M., Müller, M. A., Drexler, J. F., Glende, J., Erdt, M., Gützkow, T., ... Herrler, G. (2013). Differential Sensitivity of Bat Cells to Infection by Enveloped RNA Viruses: Coronaviruses, Paramyxoviruses, Filoviruses, and Influenza Viruses. *PLoS ONE*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072942>
- Jakob-hoff, R. M., Macdiarmid, S. C., Miller, P. S., & Kock, R. (2014). *Manual of Procedures for Wildlife Disease Risk Analysis*.
- Jolaoluwa Awosanya, E., Ogundipe, G., Babalobi, O., & Omilabu, S. (2013). Prevalence and correlates of influenza-a in piggery workers and pigs in two communities in Lagos, Nigeria. *Pan African Medical Journal*, *16*, 1–7. <https://doi.org/10.11604/pamj.2013.16.102.1450>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990–993. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature06536>
- Juozapaitis, M., Aguiar Moreira, E., Mena, I., Giese, S., Riegger, D., Pohlmann, a, ... Schwemmler, M. (2014). An infectious bat-derived chimeric influenza virus harbouring the entry machinery of an influenza A virus. *Nat Commun*, *5*, 4448. <https://doi.org/10.1038/ncomms5448>
- Kilbourne, E. D. (2006). Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(1), 9–14. <https://doi.org/10.3201/eid1201.051254>
- Kuiken, T., Holmes, E. C., McCauley, J., Rimmelzwaan, G. F., Williams, C. S., & Grenfell, B. T. (2006). Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science*, *312*(5772), 394–397. <https://doi.org/10.1126/science.1122818>
- Longdon, B., Brockhurst, M. A., Russell, C. A., Welch, J. J., & Jiggins, F. M. (2014). The Evolution and Genetics of Virus Host Shifts. *PLoS Pathogens*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004395>

- Luis, A. D., Hayman, D. T. S. D., O'Shea, T. J. T., Cryan, P. P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C. J., ... Shaffer, M. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?, *280*, 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
- Mackenzie, J. S., & Jeggo, M. (2013). Reservoirs and vectors of emerging viruses. *Current Opinion in Virology*, *3*(2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.02.002>
- Mandl, J. N., Ahmed, R., Barreiro, L. B., Daszak, P., Epstein, J. H., Virgin, H. W., & Feinberg, M. B. (2015). Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell*, *160*(1–2), 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.003>
- Manjarrez Zavala, M. E., & Arenas López, G. (1999). Virus influenza : Enigma del pasado y del presente. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, *12*, 290–299. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-1999/in994h.pdf>
- Marshall, C. J., & Liebherr, J. K. (2000). Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography*, *27*(1), 203–216. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2000.00388.x>
- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 229–265. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>
- McCloskey, B., Dar, O., Zumla, A., & Heymann, D. L. (2014). Emerging infectious diseases and pandemic potential: Status quo and reducing risk of global spread. *The Lancet Infectious Diseases*, *14*(10), 1001–1010. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70846-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70846-1)
- Medellín, R. A., Arita W, H. T., & Sánchez, O. (1997). *Identificación de los murciélagos de México*. (Asociación Mexicana de Mastozoología, Ed.). México.
- Medellín, R. A., Equihua, M., & Amin, M. A. (2000). Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in neotropical rainforest. *Conservation Biology*, *14*(6), 1666–1675. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99068.x>
- Mehle, A. (2014). Unusual influenza A viruses in bats. *Viruses*, *6*, 3438–3449. <https://doi.org/10.3390/v6093438>
- Mello, M. A. R., Kalko, E. K. V., & Silva, W. R. (2008). Movements of the bat *Sturnira lilium* and its role as a seed disperser of Solanaceae in the Brazilian

Atlantic forest. *Journal of Tropical Ecology*, 24(2), 225–228.
<https://doi.org/10.1017/S026646740800480X>

- Munoz, O., Nardi, M. De, Meulen, K. Van Der, Reeth, K. Van, Koopmans, M., Harris, K., ... Cattoli, G. (2015). Genetic Adaptation of Influenza A Viruses in Domestic Animals and Their Potential Role in Interspecies Transmission : A Literature Review. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-1004-1> falta información
- Nelson, M. I., & Vincent, A. L. (2014). Reverse zoonosis of influenza to swine : new perspectives on the human – animal interface. *Trends in Microbiology*, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.002>
- Nelson, M. I., & Vincent, A. L. (2015). Reverse zoonosis of influenza to swine: New perspectives on the human-animal interface. *Trends in Microbiology*, 23(3), 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.002>
- O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Cunningham, A. a., Fooks, A. R., Hayman, D. T. S., Luis, A. D., ... Wood, J. L. N. (2014). Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 741–745. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>
- Olsen, B. (2014). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 384, 1–6. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>
- OPS. (2010). DIAGNÓSTICO DE VIRUS INFLUENZA Procedimientos de Diagnóstico del Virus Influenza en Mamíferos y Aves. *Manual OPS*, 64.
- Ortega, J., Arita, H. T. H. T. H. T. H. T., & Arita, H. T. H. T. H. T. H. T. (1998). Neotropical-Nearctic Limits in Middle America as Determined by Distributions of Bats. *Journal of Mammalogy*, 79(3), 772. <https://doi.org/10.2307/1383088>
- Piñeyro, P. E., Baumeister, E., Cappuccio, J. A., Machuca, M. A., Quiroga, M. A., Tedoroff, T., & Perfumo, C. J. (2010). Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: Evaluación mediante inhibición de la hemaglutinación y ELISA. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), 98–101.
- Plowright, R. K., Eby, P., Hudson, P. J., Smith, I. L., Westcott, D., Bryden, W. L., ... McCallum, H. (2015). Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20142124. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2124>
- Poole, D. S., Yú, S. N., Cai, Y., Dinis, J. M., Müller, M. a, Jordan, I., ... Mehle, A. (2014). Influenza A Virus Polymerase Is a Site for Adaptive Changes During Experimental Evolution in Bat Cells. *Journal of Virology*, 88(21), 12572–12585.

<https://doi.org/10.1128/JVI.01857-14>

- Potter, C. W. (2001). A history of influenza. *Journal of Applied Microbiology*, *91*, 572–579. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01492.x>
- Runstadler, J., Hill, N., Hussein, I. T. M., Puryear, W., & Keogh, M. (2013). Connecting the study of wild influenza with the potential for pandemic disease. *Infection, Genetics and Evolution*, *17*, 162–187. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.020>
- Salazar, M. I., López-Ortega, O., León-Ávila, G., Ramírez-González, J. E., & Castro-Mussot, M. E. (2010). El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. *Gaceta Médica de México*, *146*(3), 199–206.
- Saldaña-Vázquez, R. A., Sosa, V. J., Hernández-Montero, J. R., & López-Barrera, F. (2010). Abundance responses of frugivorous bats (Stenodermatinae) to coffee cultivation and selective logging practices in mountainous central Veracruz, Mexico. *Biodiversity and Conservation*, *19*(7), 2111–2124. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9829-6>
- Schrauwen, E. J., & Fouchier, R. A. (2014). Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerging Microbes & Infections*, *3*(0), e9. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.9>
- Shaw, T. I., Srivastava, A., Chou, W. C., Liu, L., Hawkinson, A., Glenn, T. C., ... Schountz, T. (2012). Transcriptome Sequencing and Annotation for the Jamaican Fruit Bat (*Artibeus jamaicensis*). *PLoS ONE*, *7*(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048472>
- Smith, I., & Wang, L. F. (2013). Bats and their virome: An important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Current Opinion in Virology*, *3*(1), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>
- Ssematimba, A., Malladi, S., Bonney, P. J., Flores-Figueroa, C., Muñoz-Aguayo, J., Halvorson, D. A., & Cardona, C. J. (2018). Quantifying the effect of swab pool size on the detection of influenza A viruses in broiler chickens and its implications for surveillance. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1602-1>
- Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D. a A., Chen, L.-M., ... Donis, R. O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*, 4269–4274. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116200109>
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., ... Donis, R. O. (2013).

- New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathogens*, 9(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003657>
- Torremorell, M., Corzo, C. A., Morrison, R. B., Dee, S., & Culhane, M. (2013). Airborne Detection and Quantification of Swine Influenza A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. *PLoS ONE*, 8(8), e71444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071444>
- Turkington, H. L., Juozapaitis, M., Kerry, P. S., Aydillo, T., Ayllon, J., García-Sastre, A., ... Hale, B. G. (2015). Novel Bat Influenza Virus NS1 Proteins Bind Double-Stranded RNA and Antagonize Host Innate Immunity. *Journal of Virology*, 89(20), 10696–10701. <https://doi.org/10.1128/JVI.01430-15>
- Valdez, L. M. (2013). Influenza : La importancia de la vigilancia y prevención. *Revista Médica Herediana*, 24, 3–5.
- Vigueras Galvan, A. L. (2014). *Relación entre la estructura de comunidades y la infección por hantavirus en dos escalas espaciales en roedores del noroeste de Chihuahua, México*. Universidad Nacional Autónoma de México. indicar el nivel de la tesis (Lic, Maes...)
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 152–79. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09940.x>
- Wibbelt, G., Moore, M. S., Schountz, T., & Voigt, C. C. (2010). Emerging diseases in Chiroptera: why bats? *Biology Letters*, 6, 438–440.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0267>
- Wiethoelter, A. K., Beltrán-Alcrudo, D., Kock, R., & Mor, S. M. (2015). Global trends in infectious diseases at the wildlife-livestock interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(31), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422741112>
- Wikramaratna, P. S., Sandeman, M., Recker, M., & Gupta, S. (2013). The antigenic evolution of influenza: Drift or thrift? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1614).
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0200>
- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., & Gao, G. F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 22(4), 183–191.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010>
- Zhou, B., Ma, J., Liu, Q., Bawa, B., Wang, W., Shabman, R. S., ... Ma, W. (2014). Characterization of Uncultivable Bat Influenza Virus Using a Replicative

Synthetic Virus. *PLoS Pathogens*, 10(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004420>

Zhu, X., Yang, H., Guo, Z., Yu, W., Carney, P. J., Li, Y., ... Wilson, I. a. (2012). Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18903–18908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212579109>