UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN MOLECULAR DE *ORTHOFLAVIVIRUS* EN COMUNIDADES DE AVES EN EL ESTADO DE YUCATÁN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
ERIK GUSTAVO SANTIAGO BAUTISTA

ASESORAS:
MVZ DRA. ANA LAURA VIGUERAS GALVÁN
QFB DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
MVZ M EN C. ERIKA NAYELLI HERNÁNDEZ VILLEGAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2025

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

DEDICATORIA

A todas las personas que me apoyaron para poder llegar a este momento

AGRADECIMIENTOS

A la secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por permitir trabajar con las muestras colectadas en el proyecto “Diversidad biológica, sociecosistemas y enfermedades virales emergentes en México” del PRONACES-Salud (clave 303002).

A mis asesoras Ana, Erika y la Dra. Rosa Elena por brindarme todo su apoyo en este proyecto, a Omar, María José, Marco, Montserrat, Ivette y a todas las personas del laboratorio de virología y de ELDORADO, que con su ayuda pude realizar satisfactoriamente este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN 1

INTRODUCCIÓN 3

MARCO TEÓRICO 6

MATERIALES Y MÉTODOS 33

RESULTADOS 43

DISCUSIÓN 54

CONCLUSIONES 62

REFERENCIAS..... 64

RESUMEN

SANTIAGO BAUTISTA ERIK GUSTAVO. Detección molecular de *Orthoflavivirus* en comunidades de aves en el estado de Yucatán (bajo la dirección de: MVZ Dra. Ana Laura Vigueras Galván, QFB Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y MVZ M. en C. Erika Nayelli Hernández Villegas).

Los *Orthoflavivirus* infectan anualmente alrededor de 400 millones de personas alrededor del mundo. Estos arbovirus son transmitidos principalmente por mosquitos del género *Culex* y algunas especies de aves, especialmente del orden Passeriformes, actúan como reservorios. En el estado de Yucatán, la alta riqueza de especies de aves silvestres y el drástico cambio en el uso de suelo hacia zonas de aprovechamiento agropecuario, subrayan la necesidad de monitorear la circulación de *Orthoflavivirus* en la región. El principal objetivo de este estudio es identificar diferencias en la estructura de las comunidades de aves en cuatro localidades con diferentes usos de suelo (Conservado, Diversificado, Rural y Urbano) en Yucatán y describir su asociación con la prevalencia de *Orthoflavivirus*. Se analizaron muestras de hisopado cloacal de especies de aves consideradas como reservorios o posibles reservorios de *Orthoflavivirus* usando una RT-PCR anidada para amplificar un fragmento del gen NS5. Un total de 259 muestras fueron analizadas, sin resultados positivos. Sin embargo, se observó una disminución en la diversidad de las comunidades de aves en las localidades con mayor densidad

poblacional humana y pérdida de cobertura vegetal nativa. Estos hallazgos resaltan la importancia de promover la conservación de la biodiversidad, así como la necesidad de realizar un monitoreo continuo de los *Orthoflavivirus* en la región, complementando estos análisis con estudios serológicos para obtener una perspectiva integral de la situación epidemiológica y establecer estrategias de acción inmediata en caso de un incremento en la incidencia de enfermedades causadas por *Orthoflavivirus* en la población humana.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se ha registrado un aumento significativo de enfermedades infecciosas, tanto emergentes como reemergentes (Medina-Vogel, 2010; Soler-Tovar *et al.*, 2013). Se estima que el 75% de estas enfermedades son de origen zoonótico y el 80% de ellas son de etiología viral (Recht, Schuenemann and Sánchez-Villagra, 2020).

La intensificación de actividades humanas como la urbanización, la agricultura y la deforestación han llevado a la fragmentación y pérdida de hábitats naturales, alterando las dinámicas de interacción entre humanos, animales silvestres, vectores y patógenos, lo que incrementa el riesgo de transmisión de enfermedades a las poblaciones humanas que habitan en las regiones donde ocurre la transformación de los gradientes (Badii *et al.*, 2015; Figueroa-Pérez, Luna-Aragón and Reyes-Silva, 2021).

La península de Yucatán posee una alta biodiversidad, por lo que es un área relevante para el estudio de enfermedades zoonóticas (Farfán-Ale *et al.*, 2004). De igual manera, la región enfrenta problemas ambientales como son altos niveles de deforestación y cambio de uso de suelo, principalmente por actividades agropecuarias y de urbanización. Estas transformaciones ambientales no solo afectan la biodiversidad, sino que también modifican las interacciones entre especies, aumentando la probabilidad de transmisión de patógenos zoonóticos (Ostfeld, 2009; Comisión Nacional Forestal, 2022).

Dentro de los patógenos zoonóticos que se ven influenciados por la modificación de las áreas naturales y la pérdida de la biodiversidad podemos encontrar a los *Orthoflavivirus*, que son un género viral perteneciente a la familia *Flaviviridae*, la cual alberga distintos arbovirus, algunos de los cuales han tomado mayor relevancia en los últimos 20 años, como son el virus virus Zika, el virus del Dengue (responsable de 390 millones de casos de enfermedad al año en el mundo) y el Virus del Oeste del Nilo, que al introducirse en el continente americano en el año 1999 causó alrededor de 12,000 casos de meningitis/encefalitis y arriba de 1,100 decesos humanos en Estados Unidos (Murray, Mertens and Desprès, 2010; Paixão, Teixeira and Rodrigues, 2018).

En los ciclos de transmisión de algunos *Orthoflavivirus*, como el Virus de la Encefalitis de San Luis o el Virus del Oeste del Nilo, se han reportado algunas especies de aves como reservorios y mosquitos del género *Culex* como vectores (Blitvich, 2008; Díaz *et al.*, 2011; Habarugira *et al.*, 2020). Estudios previos han documentado la presencia serológica y molecular de estos virus en animales y humanos en diversas regiones de México como en el noreste del país (Chihuahua y Coahuila) y la zona costera del golfo de México (Tamaulipas, Veracruz y Tabasco), incluyendo la península de Yucatán, esto destaca la necesidad de un monitoreo constante para comprender mejor su ecología y dinámica de transmisión (Estrada-Franco *et al.*, 2003; Fernández-Salas *et al.*, 2003; Farfán-Ale *et al.*, 2004; Chaves *et al.*, 2016; Ortíz-Esquivel *et al.*, 2021).

Este estudio propone realizar un monitoreo molecular de la circulación de *Orthoflavivirus* en diferentes comunidades de aves silvestres en localidades con

diferentes usos de suelo (conservado, diversificado, rural de manejo intensivo y urbano) en el estado de Yucatán.

Mediante la detección molecular de estos virus en muestras de hisopado cloacal de aves silvestres capturadas en estas regiones, se busca proporcionar información que ayude a realizar una evaluación del riesgo de transmisión de *Orthoflavivirus* en la región, además de la generación de conocimiento sobre la prevalencia y distribución de estos virus en Yucatán. Los resultados de este estudio aportarán información para futuros análisis ecológicos, moleculares y sociales que permitirán el desarrollo de estrategias de vigilancia y control epidemiológico, para mitigar los riesgos de brotes en la población humana y promover la conservación de los ecosistemas locales.

MARCO TEÓRICO

1. *Orthoflavivirus*

Los *Orthoflavivirus* infectan distintas especies (aves, murciélagos, primates, roedores), y generalmente se transmiten a través de vectores, ecológicamente se pueden clasificar en cuatro grupos con base en el vector responsable de su transmisión, (1) *Orthoflavivirus* transmitidos por mosquitos (MBFV); (2) *Orthoflavivirus* transmitidos por garrapatas (TBFV); (3) *Orthoflavivirus* específicos de insectos (ISFV); y (4) *Orthoflavivirus* sin vector conocido (NKFV) (Villordo *et al.*, 2016; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2023) .

Dentro del grupo 1 (MBFV) podemos encontrar *Orthoflavivirus* transmitidos por mosquitos del género *Culex* (como el Virus del Oeste del Nilo, El Virus de la Encefalitis de San Luis y el Virus de la Encefalitis Japonesa) los cuales han suscitado un gran interés debido a que poseen un alto potencial zoonótico, pero además afectan tanto la salud como la conservación de aves silvestres por su papel como hospederos dentro de los ciclos de transmisión (Zoladek and Nisole, 2023). En Norteamérica se ha encontrado evidencia serológica y molecular para el Virus del Oeste del Nilo y el Virus de la Encefalitis de San Luis, mientras que en Sudamérica se ha reportado evidencia serológica de otros *Orthoflavivirus* como el Virus Ilheus (ILHV) y el Virus Rocio (ROCV) (Long, 2007; Cardozo et al., 2023; Plante et al., 2023).

a. Generalidades

Los virus del género *Orthoflavivirus* son miembros de la familia *Flaviviridae*, la cual comprende cuatro géneros virales: *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* y *Orthoflavivirus (*antes *Flavivirus)* (Pierson and Diamond, 2020; Postler *et al.*, 2023). Los *Orthoflavivirus* presentan una morfología esférica de 50nm de diámetro. Son virus envueltos con un genoma ARN de cadena sencilla en sentido positivo, [ssRNA(+)] (Paixão, Teixeira and Rodrigues, 2018).

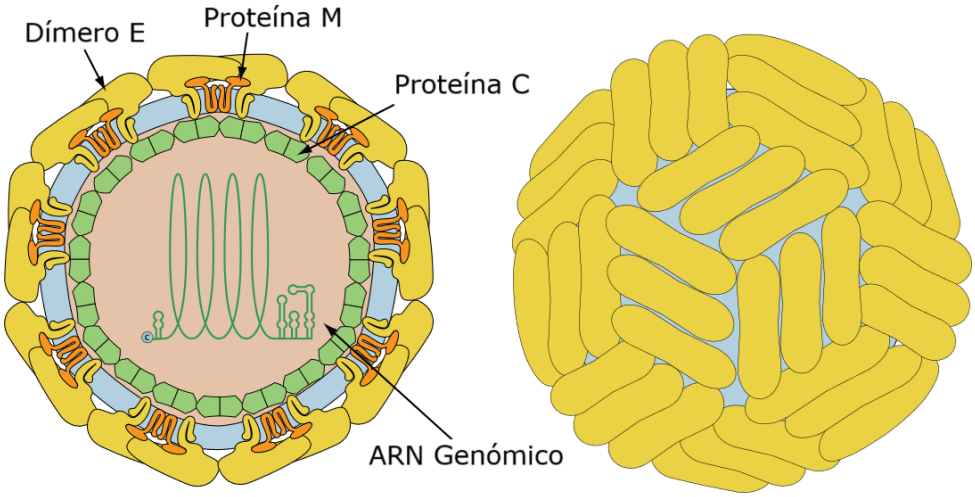


Fig.1: Representación del virión maduro de *un* Orthoflavivirus (Swiss Institute of Bioinformatics, 2003)

El tamaño del genoma es de aproximadamente 11 kb, se organiza en un marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una poliproteína única que es procesada co- y postraduccionalmente por proteasas virales y celulares del hospedador,

produciendo tres proteínas estructurales (cápside, pre-membrana y envoltura) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) en ese orden (Fig. 2). La función de cada proteína puede verse en la tabla 1.

Tabla 1. Resúmen de las proteínas del Virus del Oeste del Nilo y su función (Modificado de Habarugira et al., 2020)

Proteína viral	Principal función
C	Encapsidación y desencapsidación del ARN Activación de la vía de la apoptosis y muerte celular
prM/M	Ensamblaje del virus Fusión virus-célula hospedadora
E	Unión del virus a los receptores de la célula hospedadora Protección de las partículas víricas Fusión de la membrana vírica con la célula hospedadora
NS1	Replicación del ARN vírico Aumento de la adhesión del virus en el retículo endoplásmico Estabilidad del virus Evasión inmunitaria (inhibición de la activación del complemento)
NS2A	Replicación del ARN vírico y ensamblaje de viriones Evasión inmunitaria (interrupción de la transcripción del IFN)
NS2B	Cofactor de la actividad de la proteasa NS3 Replicación y ensamblaje del virus
NS3	Serina proteasa (N-terminal) ARN helicasa (C-terminal)
NS4A	Reorganización de la membrana vírica Inhibidor de la respuesta del huésped al interferón α/β
NS4B	Evasión inmunitaria (inhibidor del interferón α/β del huésped) Replicación vírica (potenciador de la actividad NS3hel)
NS5	Antagonista de IFN-α y β Evasión de la respuesta inmunitaria innata (antagonista del IFN) Metiltransferasa (N-terminal) ARN polimerasa dependiente de ARN (C-terminal)

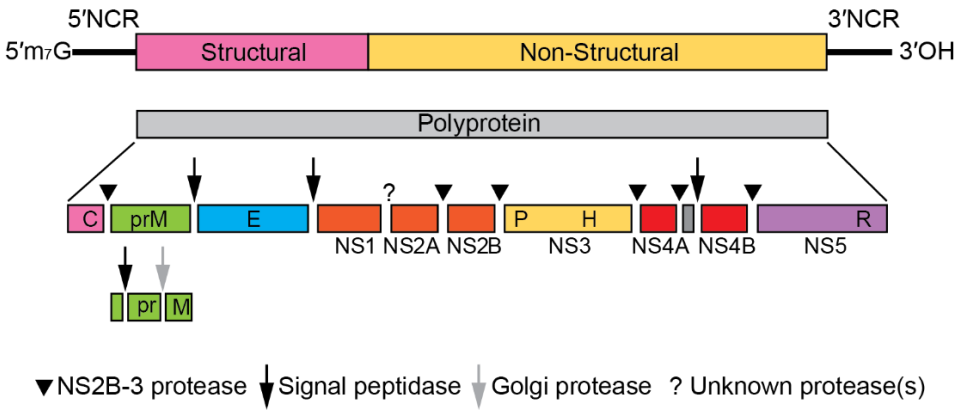


Fig. 2: Representación esquemática del genoma de los *Orthoflavivirus.* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2023).

b. Ciclo de replicación

Las proteínas de tirosina quinasa de la familia TAM, TIM, lectinas tipo C, integrinas, lamininas y heparán sulfato se han identificado como los receptores que utilizan los *Orthoflavivirus* para la infección de las células blanco (principalmente células dendríticas), a través de endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina. Una vez que el virión se internaliza, el pH ácido del endosoma, activa una trimerización irreversible de la proteína E resultando en la exposición del péptido de fusión, provocando la fusión de la membrana del virión con la membrana endosomal, liberando así, la cápside viral dentro del citoplasma. La cápside es degradada liberando el ARN viral el cual es traducido directamente por los ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso dando como resultado una poliproteína viral, las proteasas de la célula hospedera escinden la poliproteína en sus proteínas constituyentes; estructurales y no estructurales. Las proteínas no estructurales se ensamblan formando el complejo de replicativo (RC) e inicia la

invaginación de la membrana del retículo endoplásmico para producir complejos de replicación. Los complejos de replicación traducen el ARN viral a través de una cadena intermedia de ARN negativo dando lugar a una cadena ARN positivo que se empaqueta en nuevas nucleocápsides creando viriones inmaduros. Estos viriones inmaduros se secretan en vesículas y se transportan a través de la red trans-Golgi dónde avanzan a través de vesículas de pH decreciente. Finalmente, la forma inmadura de la proteína M (prM) es cortada por la proteasa furina de la célula hospedera, donde se adquiere la envoltura viral, resultando en viriones maduros e infecciosos que luego se liberan mediante exocitosis (Fig. 3) (van den Elsen, Quek and Luo, 2021).

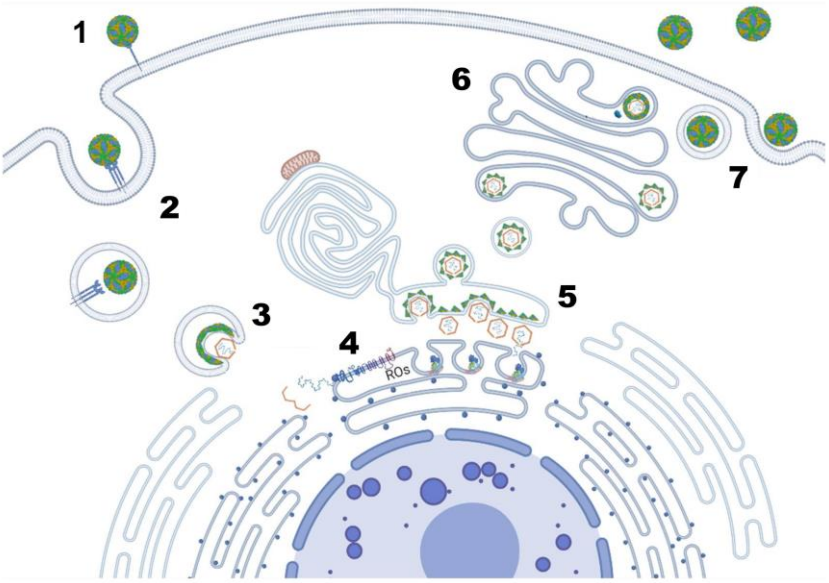


Fig. 3: Esquema del ciclo de replicación de los *Orthoflavivirus.* Los pasos se enumeran en números arábigos: 1. Unión a receptor; 2. Endocitosis; 3. Fusión de membranas y liberación de la cápside; 4. Traducción y replicación del ARN; 5. Ensamble; 6. Maduración; 7. Exocitosis de viriones maduros. Modificado de van den Elsen, Quek and Luo, 2021.

c. Proteína NS5

La proteína NS5 es la más larga (102kDa) y es la proteína más conservada entre las especies del género *Orthoflavivirus* (Fig. 4). Es fundamental en la replicación viral ya que tiene actividad de ARN-polimerasa dada por su dominio de polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) en el extremo C-terminal. Estructuralmente cuenta con tres subdominios que asemejan la forma de una mano derecha cerrada, la palma posee el sitio catalítico de la enzima, mientras que los dedos y el pulgar forman un túnel a través del cual el ARN entra en contacto con el subdominio de la palma (Egloff *et al.*, 2002; Davidson, 2009; Zhao *et al.*, 2021).

Debido a estas características y su nivel de conservación, el gen que codifica para la proteína NS5 se ha utilizado en múltiples protocolos como blanco para el diagnóstico molecular por PCR de los virus del género *Orthoflavivirus* (Zhao *et al.*, 2021).

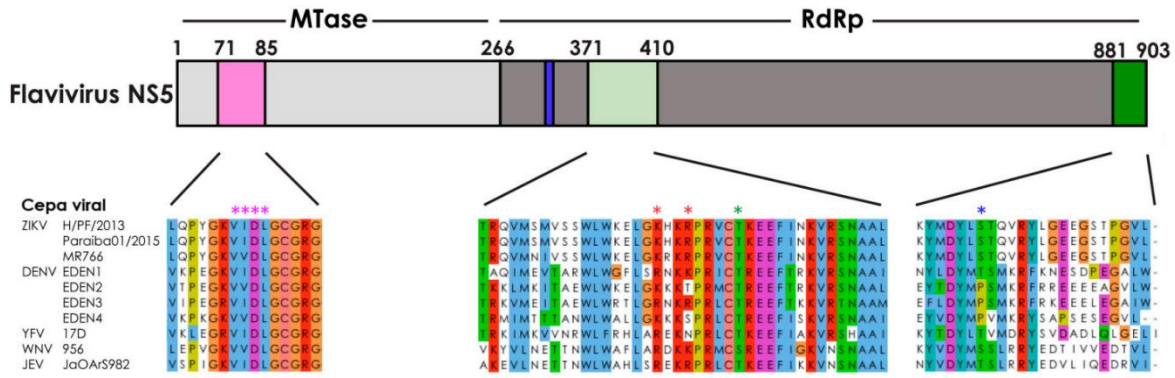


Fig. 4: Alineamiento de secuencias de diferentes regiones de la proteína NS5 de diferentes *Orthoflavivirus*. Se observa la similitud que existe en la secuencia de esta proteína entre las diferentes especies virales. Modificado de (Tan *et al.*, 2019).

En el extremo N-terminal la proteína NS5 también cuenta con un dominio metiltransferasa (MTasa) dependiente de S-adenosil-Lmetionina (SAM) que le otorga la función de metiltransferasa, función importante para los *Orthoflavivrus* para prevenir la activación inmunitaria innata y para potenciar la traducción viral (Dong *et al.*, 2014). Este dominio de MTasa estructuralmente tiene tres subdominios, uno N-terminal que contiene un sitio de unión a GTP, un núcleo que tiene función catalítica y un sitio de unión a S-adenosil-L-metionina (SAM) y uno C-terminal (Egloff *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2021).

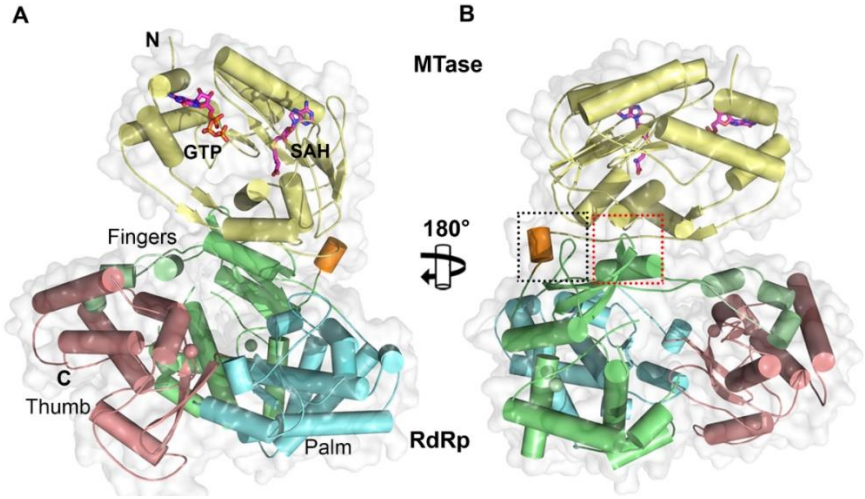


Fig. 5: Representación de la estructura de la proteína NS5 del Virus de Dengue. El dominio de la MTasa (extremo N- terminal) es de color amarillo y se observa el dominio N-terminal con el sitio de unión a GTP y la región del núcleo con el sitio de unión a S-adenosil-Lmetionina (SAM). Los dedos (Fingers) del dominio RdRp (extremo C-terminal) se muestran en verde, la palma en azul y el pulgar en salmón. Tomado de Zhao et al., 2015.

d. Ciclo de transmisión

Los *Orthoflavivirus* involucran reservorios y vectores en su ciclo de transmisión, como aves y mosquitos (principalmente del género *Culex*) respectivamente. La

transmisión de los *Orthoflavivirus* por los vectores hacia los hospederos aviares se realiza en distintos pasos, primero los mosquitos (hembra) se alimentan de aves silvestres infectadas con el virus durante la fase de viremia; el virus comienza a replicarse en células del intestino medio y posteriormente se disemina a las glándulas salivales del mosquito (órganos reservorios del virus), a este periodo se le conoce como periodo de incubación extrínseco, que puede variar entre 1 a 14 días dependiendo de la temperatura, la cepa viral y la susceptibilidad de la población del vector; cuando el mosquito supera este periodo de incubación es capaz de poder transmitir el virus a los hospedadores que forman parte de su ciclo, en este caso las aves silvestres, estableciéndose el ciclo de transmisión enzoótico ave-mosquito; finalmente en el hospedador se desarrolla el periodo de incubación intrínseco que inicia desde que el virus infecta al hospedador hasta que se desarrollan los primeros signos de enfermedad (Long, 2007; Díaz et al., 2011; Grisenti et al., 2013).

Además del ciclo enzoótico o selvático, se puede presentar una transmisión epizoótica y epidémica, la cual involucra a hospederos incidentales como los caballos y los humanos respectivamente, los cuales no forman parte del ciclo natural de transmisión, pero debido al contacto estrecho que se tiene con los vectores o por un cambio en las preferencias alimenticias del vector, estas especies terminan infectadas (Long, 2007; Díaz et al., 2011). Así mismo, en el caso del Virus del Oeste del Nilo se ha demostrado también que éste puede transmitirse a través de transfusiones de sangre contaminada en humanos (Long, 2007).

Se ha demostrado también una transmisión horizontal por ingestión oral en aves, a partir de la excreción oral y cloacal de partículas virales de aves infectadas, este

tipo de transmisión puede tomar importancia en las épocas en donde la densidad de vectores disminuye (temporada de sequía), así como en las zonas donde conviven distintas especies de aves en altas abundancias como las zonas de anidamiento o reproducción de las aves migratorias (Komar *et al.*, 2003).

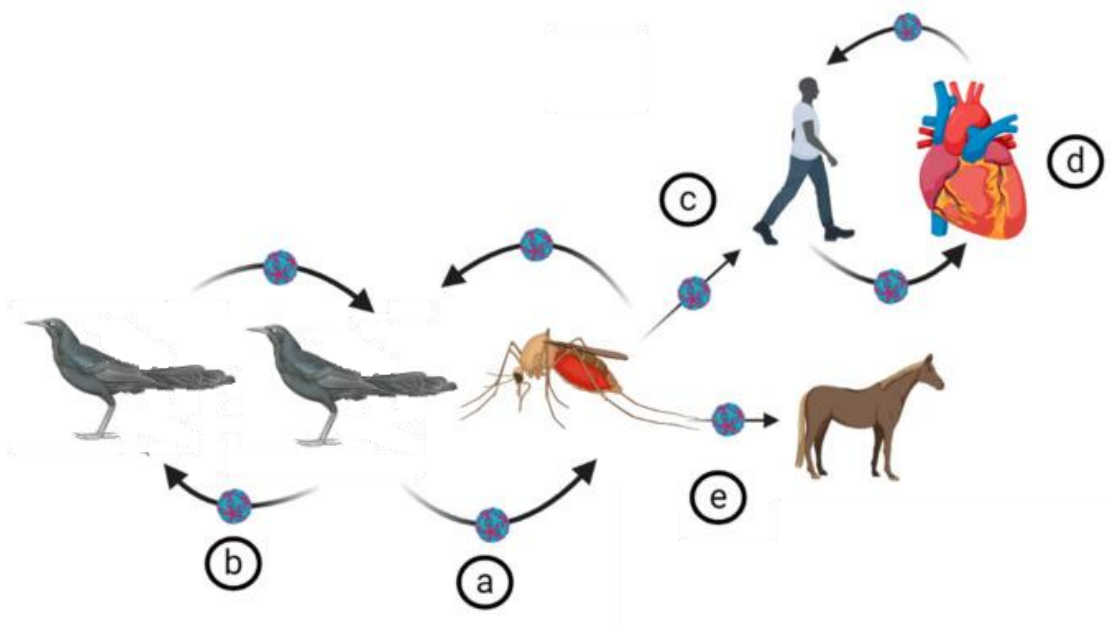


Fig. 6: Ciclo de transmisión del Virus del Oeste del Nilo. a) Ciclo de transmisión enzoótico o selvático entre el mosquito (vector) y las aves (reservorios); b) Transmisión directa entre aves por la ingestión oral de particulares virales; c) Ciclo de transmisión epidémico o urbano entre el mosquito (vector) y los humanos (hospedador incidental); d) Transmisión directa a través de transfusiones sanguíneas en humanos; e) Ciclo de transmisión epizoótico o rural entre el mosquito (vector) y animales domésticos (hospedadores incidentales). Modificado de Habarugira et al., 2020.

e. Patogenia y epidemiologia

Patogenia

Uno de los factores que influyen en la importancia de los *Orthoflavivirus* como modelo de estudio y vigilancia es su variabilidad en la presentación de signos

clínicos dependiendo de la especie viral y el hospedero final. De manera general la presentación de la enfermedad se puede clasificar dentro de dos categorías, una presentación sistémica (fiebre hemorrágica y permeabilidad vascular) y una neurológica (encefalitis y parálisis flácida) (van Leur *et al.*, 2021).

En el caso de los *Orthoflavivirus* transmitidos por mosquitos del género *Culex* como el Virus del Oeste del Nilo o el Virus de la Encefalitis de San Luis se ha reportado que además de los humanos y los caballos otras especies pueden ser susceptibles a la infección (perros, gatos, ovejas, reptiles). En ellos, los signos clínicos presentados son principalmente de tipo neurológico, manifestando cambios en el comportamiento y en el sistema motriz (ataxia, paresia, parálisis, recumbencia y fiebre) y corresponden con las anormalidades causadas en la medula espinal, los pares craneales, así como en las neuronas de las zonas del tálamo, la médula y limitadas zonas del cerebro (van der Meulen, Pensaert and Nauwynck, 2005; Long, 2007).

En el caso de las aves la patogénesis es diferente, el Virus del Oeste del Nilo se infiltra el sistema linfático y después a través de la sangre se desarrolla una viremia con la diseminación viral hacia diferentes órganos, esta fase puede durar desde 1 a 10 días. El tropismo, así como el período de viremia depende del genotipo viral, la especie del ave e incluso la edad, por ejemplo, para el período de viremia son las aves del orden Charadriiformes y Paseriformes las que tienen una mayor magnitud y duración, en contraste con las aves del orden Psitacifformes y Galliformes que tienen los periodos y las magnitudes más pequeñas (Komar *et al.*, 2003; van der Meulen, Pensaert and Nauwynck, 2005).

Así mismo los signos clínicos presentados en las aves por la infección del Virus del Oeste del Nilo dependen del tropismo viral durante la diseminación, se puede presentar letargo generalizado, plumas erizadas, posturas anormales, incapacidad para mantener la cabeza erguida y ataxia y en los casos de la enfermedad aguda la muerte se ocasiona entre las primeras 12 a 24 horas después de la infección. También puede existir una presentación sin signos clínicos aparentes a excepción de una debilidad general, siendo en algunas especies de aves silvestres la única presentación de la enfermedad (Komar *et al.*, 2003; van der Meulen, Pensaert and Nauwynck, 2005; Díaz *et al.*, 2011).

En caso del Virus del Oeste del Nilo se ha reportado que el virus se puede excretar a través de las heces, principalmente en las aves reservorias, además esta excreción puede persistir durante 4 a 7 días más que la fase virémica, sin ocurrir signos clínicos aparentes, esto permite que la detección del virus a través de muestras o hisopados cloacales sea un buen método para la vigilancia epidemiológica de los *Orthoflavivirus* (Grisenti *et al.*, 2013).

Epidemiología y circulación de los *Orthoflavivirus* en México

Puntualizando, en términos epidemiológicos existe una diferencia en el impacto de las enfermedades ocasionadas por *Orthoflavivirus* en la salud animal y humana entre México y otros países. En Estados Unidos, estos virus han ocasionado impactos importantes en las poblaciones de aves susceptibles y una enfermedad neurológica con alta mortalidad en seres humanos (Centers for Disease Control and

Prevention, 2010). Esta diferencia puede ser atribuida a diversos factores, por un lado pueden estar las dinámicas ecológicas de los reservorios, los vectores y el patógeno, otros autores mencionan que debido a la circulación de los *Orthoflavivirus* endémicos de México como el dengue virus (DENV) existe una inmunidad en seres humanos a otros *Orthoflavivirus* y por último, un factor que no impacta en la transmisión viral pero que sí afecta en las estadísticas epidemiológicas es la capacidad de detectar y diagnosticar los casos de infección por el virus del Oeste del Nilo y otros *Orthoflavivirus*, ya que mientras Estados Unidos tiene un sistema de vigilancia bien establecido y una infraestructura de salud pública sólida que permite identificar y rastrear los brotes de enfermedades de manera más efectiva, en México existe una menor capacidad de vigilancia y detección lo que podría subestimar el número real de casos (Deardorff *et al.*, 2006).

En México, se detectó el primer caso del VON en el año 2003, de acuerdo con reportes, de la Dirección General de Epidemiología (2023). Hasta el año 2023, se han registrado un total de 13 casos de infección en humanos causados por este virus en nuestro país. Adicional a estos casos, históricamente se han reportado la presencia de encefalitis ocasionadas por el virus de la encefalitis de San Luis (ESLV) desde el año 1975, además, se ha encontrado evidencia serológica del VON en humanos en México desde 1963 (González Cortés *et al.*, 1975; María and Zárate, 1978).

Así mismo, de acuerdo con algunos estudios, se ha documentado la evidencia serológica y molecular de la presencia del virus del oeste del Nilo y del virus de la encefalitis de San Luis, en comunidades de aves silvestres y mosquitos en el norte

de México (Chihuahua y Coahuila) y de los estados que conforman la zona costera del golfo de México (Tamaulipas, Veracruz, Tabasco) así como en el estado de Yucatán (Estrada-Franco *et al.*, 2003; Fernández-Salas *et al.*, 2003; Farfán-Ale *et al.*, 2004). Sin embargo, dentro de las limitaciones de estos estudios es la detección serológica, la cual podría indicar una interacción entre el virus y el hospedador, pero no permite identificar el patógeno responsable de la infección, mientras que la detección molecular, no solo permite la detección directa del patógeno, también, con la posterior secuenciación del material genético del virus se pueden identificar variaciones genéticas (William Provance et al., 2024).

En Yucatán, se ha llevado a cabo un seguimiento constante de la actividad del Virus del Oeste del Nilo. En un estudio reciente realizado por Ortíz-Esquivel et al., 2021 realizaron la detección en sueros de caballos mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática de captura (MAC-ELISA) para la detección de IgM específicas contra el VON en los municipios de Tizimín y Panabá, al oriente de Yucatán, con una prevalencia del 4.3% con títulos elevados de IgM. Mientras que, Chaves et al., 2016 documentaron la presencia molecular del VON en aves silvestres muestreadas en Yucatán durante el periodo de marzo a septiembre de 2012 con una prevalencia del 13%. Estos resultados enfatizan la necesidad de mantener una vigilancia epidemiológica continua en aves, ya sean migratorias o residentes, con el fin de comprender la transmisión de los *Orthoflavivirus* en la región de Yucatán, principalmente en los ciclos enzoóticos o silvestres donde no se han monitoreado de manera sistemática a pesar de que en poblaciones humanas

circulan algunos *Orthoflavivirus* como el Virus Dengue y Zika (Dirección General de Epidemiología, 2023).

2. Aves silvestres en la transmisión de enfermedades

La participación de las aves en la transmisión de enfermedades presenta una red de interacciones, que abarca desde su función como reservorios naturales para patógenos hasta su contribución global en la diseminación de estos (Marcos, 2013). El amplio rango de movimiento ya sea a nivel regional o interregional a través de las migraciones, les otorga un papel fundamental en la propagación de patógenos, ya sea de transmisión directa, como el virus de influenza A, o en arbovirosis, como el virus del Oeste del Nilo (Reed *et al.*, 2002; Marcos, 2013).

En las enfermedades transmitidas por vectores, la tasa de transmisión está influenciada en parte por la tasa de contacto entre vectores e individuos reservorios. Las aves, debido a su densidad poblacional y movilidad, representan un grupo de interés particular, ya que estos factores modulan la frecuencia de contacto y, por tanto, el riesgo de transmisión de patógenos. Este rol clave convierte a las aves en un componente crucial en los estudios sobre la propagación de enfermedades arbovirales (Marcos, 2013).

México, por sus características biogeográficas, al estar entre la región Neártica y Neotropical, así como su compleja orografía hacen que sea el país de Norteamérica con la mayor diversidad de especies de aves, con una riqueza de entre 1,120 y 1,150 especies, representando cerca del 11% del total de especies en todo el mundo, contando además con 26 órdenes (65%), 95 familias (41%) y 493 géneros

(22%) en el país (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2023).

Los ecosistemas que albergan predominantemente la mayor diversidad de especies aviares en México son la selva alta perennifolia, que representa el 29% de dicha diversidad, seguida por la selva baja caducifolia, que contribuye con el 24%; posteriormente, se destacan los entornos boscosos, como el bosque de pino y encino, así como el bosque mesófilo de montaña, seguidos por ambientes de tipo árido, como los matorrales (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014).

La mayoría de las especies de aves del país son residentes permanentes; sin embargo, al tener distintas rutas de aves migratorias que cruzan del neártico hacia el neotrópico (Fig. 7), se destaca una considerable cantidad de especies migratorias estacionales, principalmente aquellas que visitan el país en invierno, seguidas por las aves migratorias en tránsito (Berlanga and Rodríguez, 2010; Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014).

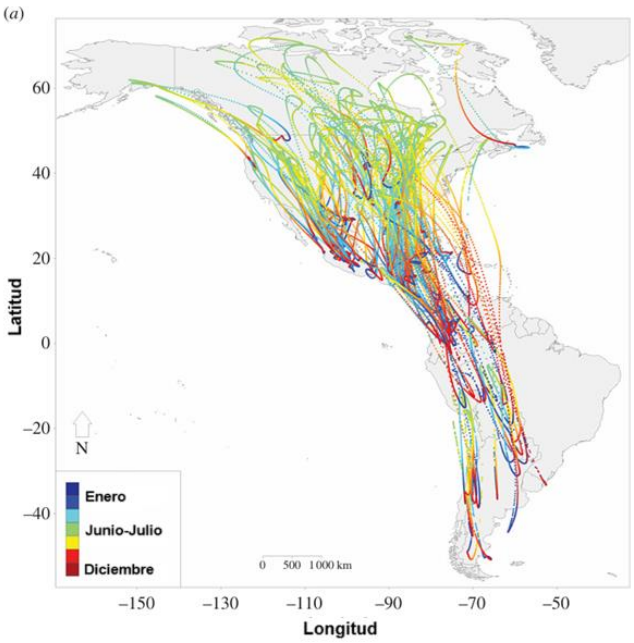


Fig. 7. Trayectorias de migración a nivel poblacional en el hemisferio oeste para 118 especies de aves migratorias durante el periodo 2002-2014. Modificado de: La Sorte et al., 2016

La distribución geográfica de las especies de aves en México, evaluada según las entidades geopolíticas, revela una concentración significativa a lo largo de la vertiente del golfo de México y la península de Yucatán, y es particularmente el estado de Yucatán el que se caracteriza por albergar una alta diversidad de aves debido a que además de la alta riqueza de especies neotropicales en el país, su ubicación lo hace ser un estado que forma parte de la ruta migratoria de muchas especies de aves migratorias neárticas ya sea como destino o como un punto de tránsito, sumado a lo anterior al ser una unidad fisiográfica aislada (junto con Campeche y Quintana Roo) presenta un alto nivel de endemismo de especies de aves, principalmente en la franja norte del estado (Cortés-Ramírez, Gordillo-Martínez and Navarro-Sigüenza, 2012; Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014).

- Papel de las aves en la transmisión de enfermedades ocasionadas por *Orthoflavivirus*

Algunas especies de aves, principalmente del Orden Passeriformes como *Passer domesticus* son consideradas como reservorios competentes para la amplificación de los *Orthoflavivirus* en el ciclo en el que estén involucrados, debido a que mantienen una concentración de virus mayor a 10^5 UFP/ml (UFP: unidades formadoras de placa), siendo esta la concentración viral mínima necesaria para infectar a un mosquito vector y durante el tiempo necesario (10-12 días en promedio) (Díaz *et al.*, 2011). Sin embargo, se deben considerar las características intrínsecas del virus (genotipo, patogenicidad), de los vectores (preferencias alimenticias) y de los hospederos, particularmente en estos últimos pueden existir relaciones interespecíficas que involucren la predilección de los mosquitos por alimentarse de cierta especie como se ha visto con *Turdus migratorius* en Washingtong, D.C, así mismo las marcadas disparidades en la historia de vida (crecimiento, reproducción), el comportamiento y la fisiología e inmunidad de los individuos desempeñan un papel crucial en su exposición a los *Orthoflavivirus* afectando así la carga viral y la subsecuente transmisión de estos en las poblaciones (Martin *et al.*, 2016).

Es de suma importancia considerar que, en un ambiente, la prevalencia de *Orthoflavivirus* no solo se influye por los niveles de viremia que presentan los reservorios, sino que también requiere una consideración más amplia que abarque factores ecológicos y biológicos de los reservorios, el patógeno y los vectores. La dinámica de interacción entre aves y mosquitos, influenciada por preferencias

específicas de los vectores, la abundancia de determinadas especies de aves, la plasticidad de hospederos de los *Orthoflavivirus* transmitidos por mosquitos, así como aspectos del ciclo de vida de las aves, como la susceptibilidad inmunológica, las actividades diarias como anidamiento y perchaje en áreas cercanas a los vectores, también influyen en la probabilidad de contacto con el virus, desempeñando un papel crucial en la prevalencia en los ciclos enzoóticos (Martin *et al.*, 2016).

3. Relación de la biodiversidad con las enfermedades emergentes y reemergentes

El incremento en la incidencia de enfermedades en los últimos años ha remarcado la importancia de las interacciones entre la fauna silvestre los humanos y el medio ambiente en la emergencia y reemergencia de enfermedades infecciosas (Keusch *et al.*, 2022; Sánchez *et al.*, 2022).

La conceptualización de zoonosis, acuñada por primera vez en el siglo XIX para describir enfermedades compartidas entre animales y humanos, ha evolucionado con el tiempo y se han incluido otros factores que se involucran con la emergencia de enfermedades zoonóticas, como el ambiente, la salud animal, la calidad del agua, etc. dando como resultado el concepto de Una Salud, siendo un enfoque integrador que busca optimizar de forma sostenible la salud de las personas, los animales y los ecosistemas, haciendo uso de distintas disciplinas, tales como la ecología de enfermedades, la cual busca analizar y comprender los factores que influyen en el impacto de las enfermedades infecciosas considerando aspectos

biológicos, fisicoquímicos, conductuales y sociales a través del análisis de los cambios en el ambiente, en la diseminación, virulencia y capacidad de transmisión de los patógenos y probabilidad de exposición a estos (Carrillo and Viviana, 2014; Joint Tripartite FAO OIE WHO and UNEP Statement, 2021; Sánchez *et al.*, 2022).

Desde el enfoque de la ecología de se ha descrito que el incremento en la emergencia y reemergencia de enfermedades es favorecida por actividades antropogénicas como el desarrollo socioeconómico, el comercio de fauna silvestre, la urbanización y los sistemas intensivos de producción pecuaria, las cuales provocan cambios ecológicos de los sistemas biológicos a través de la alteración en las interacciones entre animales silvestres, animales domésticos y humanos o cambios en la abundancia y riqueza de especies (Horby *et al.*, 2014).

Numerosos estudios respaldan que las alteraciones en el paisaje, aumentan el riesgo de brotes de enfermedades esto debido a que cambios en el paisaje, como la fragmentación de hábitat y la perdida de áreas naturales modifican la disponibilidad de recursos, concentrando poblaciones de animales en pequeñas áreas creando focos de transmisión intra o interespecíficos (Estrada-Peña *et al.*, 2014; Diuk-Wasser, Vanacker and Fernandez, 2021; Keesing and Richard S Ostfeld, 2021; Platto *et al.*, 2021).

Keesing y Ostfeld, 2021 proponen tres modelos conceptuales que vinculan la diversidad de hospederos con la aparición de enfermedades zoonóticas en humanos. En el primer modelo se sugiere que la riqueza de especies de hospederos contribuye a una diversidad de patógenos, los cuales podrían transmitirse a los humanos; en el segundo, algunas especies son más propensas a albergar

patógenos zoonóticos (reservorios) y la riqueza de estos hospederos zoonóticos resulta más importante para determinar el riesgo de una emergencia zoonótica. Finalmente, en el tercer modelo se plantea que tanto la riqueza como la abundancia de los reservorios zoonóticos determinan el riesgo de emergencia zoonótica.

Para comprender de manera adecuada las hipótesis que relacionan la diversidad de hospederos reservorios con el aumento o la disminución en la prevalencia de enfermedades es importante comprender el papel de algunas especies silvestres como reservorios de patógenos zoonóticos. La definición de reservorio ha evolucionado a lo largo de los años, conceptos previos lo definían como aquella especie que albergaba un patógeno sin desarrollar una patogenia, otras definiciones no le adjudican sujeto y lo establecen como un sistema ecológico en el cual un agente infeccioso sobrevive indefinidamente, desde el punto de vista ecológico y para motivos de este trabajo se considerará como un reservorio a las especies que (1) sean susceptibles a la infección viral, es decir permite la replicación del virus, (2) genera una viremia superior al umbral mínimo de infección durante el tiempo necesario, la cual se ha demostrado experimentalmente que se alcanza a concentraciones de virus mayor a 10^5 UFP/ml por 4-5 días para *Orthoflavivirus*, (3) ser abundantes y (4) poseer un alto grado de asociación en tiempo y espacio con el vector y el virus (Díaz *et al.*, 2011).

Las investigaciones relacionadas con el tercer modelo de Keesing y Ostfeld, 2021 explican los efectos de los cambios en la biodiversidad natural sobre los patógenos zoonóticos en las teorías denominadas como efecto de amplificación y efecto de dilución. El modelo de amplificación describe que la presencia o actividad de

hospederos puede aumentar la carga de patógenos en el entorno, aumentando así la probabilidad de transmisión a otros hospederos susceptibles (Lee and Mohd, 2020). De manera complementaria el efecto de dilución postula que, la presencia de una mayor diversidad de hospederos actúa como un factor de mitigación al reducir las oportunidades de contacto entre los patógenos zoonóticos y los hospederos susceptibles (Lee and Mohd, 2020; Keesing and Ostfeld, 2021).

No obstante, la relación entre la diversidad biológica y las enfermedades zoonóticas no es lineal ni exclusiva, existen otros factores que afectan la prevalencia de enfermedades de acuerdo con el contexto específico y se deben considerar también las características individuales de los patógenos y los hospederos, Strauss et al., 2015, demostraron cómo la competencia entre reservorios (por recursos) y la capacidad de transmisión del patógeno son los principales influyentes de la prevalencia a escala local; en casos donde los reservorios son altamente competitivos y poseen una elevada capacidad de diseminación, el aumento en la diversidad de hospedadores no presenta una significancia estadística para reducir la prevalencia de la enfermedad, a diferencia de los sistemas en los cuales los reservorios no son altamente competitivos y su capacidad de diseminación es moderada y se logra cumplir el efecto de dilución.

Dentro del contexto de las interacciones hospedero-patógeno, se destaca la presencia de un tercer componente: los vectores, lo cual introduce una complejidad adicional a las dinámicas de interacción y a la relación inherente entre la diversidad biológica y las enfermedades emergentes y reemergentes (Keesing and Ostfeld, 2021).

Se ha documentado que la variabilidad en la diversidad de hospederos puede generar dos escenarios antagónicos en las enfermedades transmitidas por vectores; por un lado, se puede observar una disminución en la incidencia de enfermedades transmitidas por estos vectores debido a la reducción de sus poblaciones, consecuencia directa de la disminución en el número de hospederos disponibles. No obstante, en otros casos, la disminución de la diversidad de hospederos puede propiciar un aumento en la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores, debido a la necesidad de los vectores de alimentarse de individuos adicionales que normalmente no serían afectados si la población de hospederos no se viera mermada (Ratti, Winter and Wallace, 2021). Es importante mencionar que se incluyen características individuales de los hospederos (especie, radio de transmisión, estacionalidad), de los patógenos (patógenos multihospederos) pero también de los vectores (preferencias alimenticias, variación en la abundancia en diferentes épocas del año) y es por ello por lo que se tiene que realizar un análisis específico de acuerdo con las características que presenta la escala espacial y la ecología del patógeno a estudiar (Miller and Huppert, 2013; Keesing and Ostfeld, 2021).

Dentro de las enfermedades transmitidas por vectores, asociadas con la pérdida de la biodiversidad están las ocasionadas por *Orthoflavivirus* (Ostfeld, 2009; Ostfeld and Keesing, 2012; Roiz *et al.*, 2019; Postler *et al.*, 2023).

El Virus del Oeste del Nilo se ha utilizado como modelo de estudio para resaltar el impacto de la pérdida de la biodiversidad, Swaddle y Calos, 2008, demostraron que una mayor diversidad de especies de aves en una región específica de Estados

Unidos se asocia con una reducción en la incidencia de este virus en la población humana. De manera contraria otras investigaciones demuestran que un aumento en la riqueza de especies de aves se relaciona con un incremento en la seroprevalencia del Virus del Oeste del Nilo, lo cual resalta la necesidad de contextualizar estos hallazgos y adoptar un enfoque integral que aborde diversos factores, considerando la escala espacial utilizada y las comunidades de hospederos en las investigaciones (Ferraguti *et al.*, 2021).

En el contexto específico de México, se alberga una gran biodiversidad. Abarcando una variada gama de ecosistemas, donde habitan una diversidad única de especies. Debido a su ubicación geográfica tropical y relieves montañosos además de su pertenencia a las regiones biogeográficas neártica y neotropical, exhibe una notable diversidad de climas, paisajes y comunidades bióticas (Luna, Castañón and Raz-Guzmán, 2011). Esta diversidad proporciona hábitats propicios para la interacción entre hospederos, vectores y sus patógenos, al presentar numerosas especies que pueden fungir como reservorios endémicos o introducidos, así como especies clave en la transmisión de enfermedades.

No obstante, como ocurre a nivel global, México enfrenta diversas problemáticas económicas y sociales que impactan la biodiversidad, tales como la destrucción de hábitats, la contaminación, la sobrexplotación, la introducción de especies exóticas y el cambio climático, pero en el contexto nacional, la problemática central radica en la pérdida de áreas naturales (Martínez-Meyer, Sosa-Escalante and Álvarez, 2014). De acuerdo con registros del 2008, aproximadamente el 50% del territorio mexicano ha perdido su cobertura vegetal original, y el 27% ha experimentado cambios en el

uso de suelo a zonas agropecuarias o urbanas (Martínez-Meyer, Sosa-Escalante and Álvarez, 2014). La tasa de deforestación, un indicador crítico de esta pérdida, alcanzó su punto máximo en 2016 con 350,898 hectáreas afectadas anualmente y desde el 2001 al 2021 se han perdido en promedio 208,850 hectáreas por año según datos oficiales, siendo que la mayor parte de las tierras deforestadas fueron transformadas en praderas o pastizales (74.43%), seguido del cambio de uso de suelo a tierras agrícolas (21.41%) y para uso de asentamientos humanos (2.41%) siendo las selvas cálido-húmedas y las selvas Cálido-secas las más afectadas (Comisión Nacional Forestal, 2022).

A nivel regional, la península de Yucatán emerge como una de las áreas más afectadas por la deforestación. Los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán se posicionan entre los diez estados con mayor deforestación durante el periodo comprendido entre 2001 y 2021. Con tasas anuales de deforestación de 24,778 ha, 10,748 ha y 12,696 ha respectivamente, estos estados han experimentado una significativa pérdida de cobertura forestal. De manera consistente con las tendencias observadas en todo el país, el principal cambio en el uso del suelo de las selvas cálido-húmedas y cálido-secas, particularmente afectadas en esta región, se ha dirigido hacia la conversión a pastizales, tierras agrícolas y asentamientos humanos (Comisión Nacional Forestal, 2022).

Así mismo, la península de Yucatán enfrenta varias problemáticas ambientales, que son comunes en el país en sus propios contextos geográficos, como lo son el cambio climático y la contaminación, sin embargo, una de las cuestiones particulares que incide en la disminución de la diversidad de especies en la región

es el cambio de uso de suelo (Ellis and Porter-Bolland, 2008).En Yucatán dicho cambio se observa por el incremento de las actividades agropecuarias y la creciente tasa de urbanización aumentando la tasa de deforestación; tan solo en el año 2016, en Yucatán se registró la pérdida del 23% de las selvas, siendo las causas principales la expansión ganadera (50%), la agricultura de subsistencia (16%), la agricultura tecnificada (13%) y los incendios forestales (10%) (Comisión Nacional Forestal, 2022). Este fenómeno indica un patrón generalizado de transformación del paisaje en la península de Yucatán, con importantes implicaciones para la biodiversidad y la sostenibilidad ambiental en la región.

Dadas las características ecológicas de Yucatán y las altas tasas de cambio de uso de suelo en el Estado, el objetivo de este estudio es realizar un monitoreo molecular de la circulación de los *Orthoflavivirus* en aves silvestres en un gradiente de uso de suelo de conservado a urbanizado.

JUSTIFICACIÓN

El rápido aumento en la tasa de deforestación y el creciente cambio de uso de suelo por zonas de aprovechamiento agropecuario y para uso de asentamiento humano en el estado de Yucatán, ha acrecentado la pérdida de diversidad biológica, al mismo tiempo que incrementa la diversidad de especies reservorias de *Orthoflavivirus* en la región, resultando en un aumento en la tasa de interacción entre humano-vector-hospedero y del riesgo de emergencia y reemergencia de enfermedades ocasionadas por estos virus.

De acuerdo con la literatura, la prevalencia molecular de *Orthoflavivirus* entre diferentes hábitats y temporadas de diversas regiones en el estado de Yucatán es variable, sugiriendo que diversos factores como la densidad de vectores y la diversidad de reservorios influye significativamente en la dinámica de transmisión viral.

Es por ello que este estudio se centra en realizar un muestreo de aves hospedadoras y el monitoreo molecular de virus del género *Orthoflavivirus* en diferentes gradientes de uso de suelo (Conservado, Diversificado, Rural de manejo intensivo y Urbano) en el estado Yucatán. Con la finalidad de proporcionar una evaluación más integral de la dinámica de transmisión de *Orthoflavivirus* en la región se consideró además realizarlo durante dos épocas del año (temporada de lluvias y secas). Este análisis contribuye al desarrollo de estrategias de detección y vigilancia epidemiológicas realizadas en la zona, con el fin de mitigar los riesgos de brotes en la población humana y promover la conservación de la biodiversidad local.

OBJETIVOS

Objetivo general

Describir la estructura de las comunidades de aves en cuatro gradientes de uso de suelo (Conservado, Diversificado, Rural y Urbano) en el estado de Yucatán e identificar su asociación con la prevalencia de *Orthoflavivirus.*

Objetivos específicos

- Caracterizar las comunidades de aves mediante índices de diversidad taxonómica en distintos gradientes de uso de suelo en el estado de Yucatán.
- Identificar la presencia del genoma de *Orthoflavivirus* en muestras de aves con distintas categorías de reservorio presentes en diferentes gradientes de uso de suelo en el estado de Yucatán.
- Evaluar la relación entre la prevalencia de *Orthoflavivirus* y el gradiente de uso de suelo (Conservado, Diversificado, Rural y Urbano).

HIPÓTESIS

El gradiente de uso de suelo influirá en la estructura de las comunidades de aves, y reflejará cambios en la prevalencia molecular de *Orthoflavivirus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la detección del genoma de *Orthoflavivirus* se utilizaron muestras de hisopado cloacal colectadas en el proyecto “Diversidad biológica, sociecosistemas y enfermedades virales emergentes en México” del PRONACES-Salud (clave 303002), bajo las siguientes condiciones:

1.- Diseño del muestreo

Los periodos de muestreo se eligieron tomando en cuenta la estacionalidad, realizándose en dos temporadas del año, lluvias (año 2022) y secas (año 2023).

Se seleccionaron muestras de aves de cuatro localidades del estado de Yucatán en un gradiente de uso de suelo categorizado en función del porcentaje de vegetación nativa e inducida y la densidad poblacional (Fig. 8) categorizadas de la siguiente manera:

- Conservado (C): Representado por más de 60 % de vegetación nativa y baja densidad poblacional, ubicado en la localidad de San Simón dentro de la reserva estatal del Puuc.

- Diversificado (D): Con 40% vegetación nativa y baja densidad poblacional, ubicado en la localidad de Corral, al sureste del estado de Yucatán.
- Rural de manejo intensivo (RI): Con más del 40% de vegetación inducida (pastizal, maderables, etc.) y alta producción ganadera, ubicado en el noreste del Estado.

- Urbano (U): Con más de 60% del territorio ocupado por asentamientos humanos y altamente urbanizados, ubicado en la ciudad de Mérida.

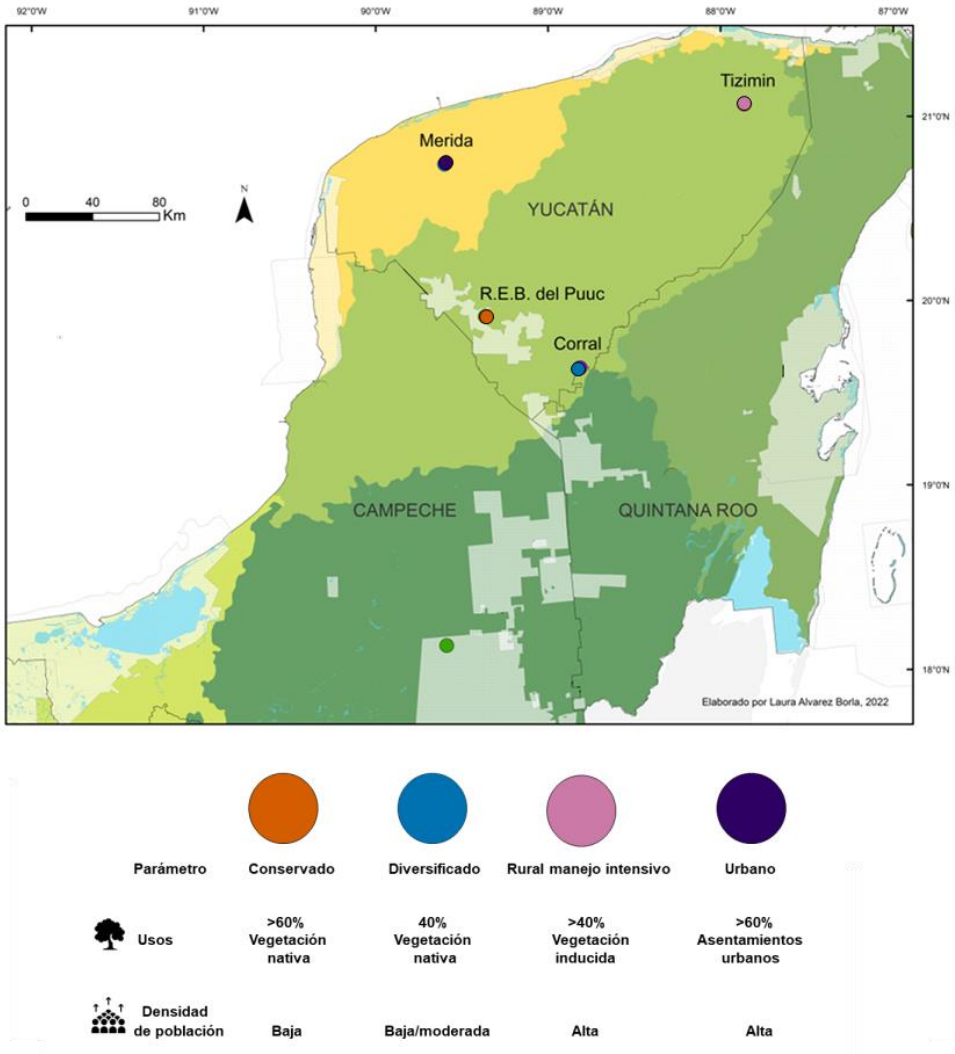


Fig. 8: Localidades de los sitios de muestreo y su categorización de acuerdo con el gradiente uso de suelo. La localidad del gradiente Conservado (R.E.B del Puuc, punto naranja) se ubica al suroeste del estado dentro de la Reserva Estatal Biocultural del Puuc; la localidad del gradiente Diversificado (Corral, punto azul) se ubica al sureste del estado dentro del municipio de Tzucacab; la localidad del gradiente Rural de manejo intensivo (Tizimín, punto rosa) se ubica al noreste del estado dentro del municipio del mismo nombre y la localidad del gradiente Urbano (Mérida, punto púrpura) se ubica al noroeste del estado dentro del municipio homónimo.

2. Manejo de individuos y obtención de muestras biológicas.

La captura de aves se realizó colocando diez redes de niebla distribuidas al azar, dentro de una parcela de 1 hectárea. Las redes permanecieron activas durante cinco horas consecutivas a partir del amanecer y se colocaron por tres días en cada sitio de colecta por temporada.

Se tomaron datos morfométricos (largo total, largo de cuerpo, largo del ala, largo del tarso y peso) e identificaron taxonómicamente, utilizando guías bibliográficas de identificación. Además, se tomaron muestras de hisopado cloacal de cada individuo, las cuales fueron almacenadas en crioviales de 1.5 ml con 500µl de medio de preservación de ácidos nucleicos (RNA later®) (Número de catálogo AM7021) y posteriormente colocadas en un tanque con nitrógeno líquido a -195.8°C para su conservación y traslado al laboratorio para su resguardo hasta su procesamiento.

Todos los procedimientos de captura, manejo y recolección de muestras se realizaron de acuerdo con las pautas de la en la Guía de Utilización de Aves silvestres para la investigación bajo la Ley General de Vida Silvestre, SEMARNAT, y con el permiso de captura FAUT-0250, Dirección General de Vida Silvestre SEMARNAT.

3.- Caracterización de las comunidades de aves

Mediante el análisis de la riqueza y la abundancia relativa de especies se caracterizaron las comunidades de aves en cada localidad. Se utilizó una adaptación del protocolo propuesto por Chao y Jost, 2012 , el cual emplea unidades

de número efectivo de especies. Este método implica la interpolación y extrapolación de las estimaciones a partir de curvas de rarefacción de la diversidad en función de la cobertura de muestreo (Ĉn = porcentaje de individuos totales muestreados en la comunidad), obteniendo componentes de la diversidad de diferentes órdenes: Diversidad de orden 0 (q=0; Riqueza específica), diversidad de orden 1 (q=1; Exponencial del índice de Shannon) y diversidad de orden 2 (q=2; Inverso del índice de Simpson). El análisis se realizó utilizando el software iNEXT (iNterpolation and EXTrapolation Online software, versión 2024) de (Chao, Gotelli and Hsieh, 2016).

La riqueza específica, también denominada diversidad de orden 0 (q=0), representa el número total de especies presentes en la comunidad sin considerar su abundancia relativa. Adicionalmente, la metodología propuesta por Chao y Jost, (2012) permite inferir la riqueza estimada con una Ĉn cercana al 100%, permitiendo estimar el porcentaje de especies detectadas en la comunidad (completitud de muestreo) a partir de la siguiente fórmula:

Completitud de muestreo = Riqueza observada/riqueza estimada

La diversidad de orden 1, también conocida como el exponencial del índice de Shannon (q=1), integra tanto la riqueza como la abundancia en términos de equidad en la distribución de especies, proporcionando una medida del número efectivo de especies igualmente abundantes. Este índice permite una interpretación más intuitiva de la biodiversidad al evitar el sesgo hacia especies extremadamente raras o dominantes. Para comparar la diversidad entre los distintos gradientes, se empleó

el análisis de intervalos de confianza al 95% (IC 95%), lo que permitió evaluar la significancia estadística de las diferencias en la estructura de las comunidades.

Se consideró que no existían diferencias significativas entre los valores estimados si los IC 95% se superponen entre muestras, con un nivel de significancia alfa de 0.05. Por el contrario, si los IC 95% no se superponen, se concluyó que las estimaciones difieren significativamente entre sí (Cumming, 2007).

Además de la comparación directa de los valores de q=1 ± IC 95%, se calculó la magnitud de la diferencia (MD) en términos porcentuales para medir la diferencia entre la diversidad de las cuatro comunidades. Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula propuesta por (Cultid-Medina and Escobar, 2019).

$$\%MD = 100 - \left(\frac{qD_{\text{muestra 2}} \times 100}{qD_{\text{muestra 1}}} \right)$$

Para evaluar la distribución de las abundancias de las especies que componen las comunidades de aves de cada localidad se usó la abundancia relativa de especies, construyendo curvas de Rango-abundancia utilizando una función logarítmica natural. Este análisis se llevó a cabo con la paquetería Biodiversity.R Ver. 2.17-1.1 (Kindt and Coe, 2005) para el software R. Adicionalmente, se empleó la diversidad de orden 2 o el inverso del índice de Simpson (q=2) para comparar cuantitativamente los niveles de diversidad en términos de dominancia entre localidades. Este índice otorga mayor peso a las especies más abundantes, permitiendo evaluar la dominancia dentro de la comunidad y proporcionando una

medida del número efectivo de especies dominantes, obteniendo un valor entre 0 e infinito, siendo los valores más cercanos a infinito los que indican una menor dominancia de pocas especies en la comunidad.

4.- Determinación del estatus reservorio

Del total de las aves capturadas, se decidió realizar el análisis molecular para la detección de *Orthoflavivirus* principalmente en las especies reportadas como reservorios, además, se incluyeron aquellas con características de un reservorio pero que no tuvieran evidencia en la literatura de su función como reservorios para *Orthoflavivirus*, así como las especies que no tienen evidencia del análisis de su estatus reservorio previo en la literatura. Para ello, se realizó una búsqueda en la literatura de las especies de aves capturadas con el fin de clasificar a los individuos muestreados de acuerdo con su estatus de reservorio, obteniendo tres categorías.

Reservorios: Aves que sostienen títulos de viremia mayores a 10^5 UFP/ml, y que cumplen con las características ecológicas descritas por Díaz et al., 2011.

Posibles reservorios: Aves con títulos de viremia menores a 10^5 UFP/ml pero que cumplan con las características ecológicas descritas por Díaz et al., 2011 y/o que pertenezcan a la misma familia que una especie reconocida como reservoria.

Sin estudiar: Especies que no cuenten con registros en la literatura sobre su estatus reservorio para los *Orthoflavivirus* pero que cuenten con alta abundancia y/o sean aves migratorias.

5. Análisis molecular para la detección de *Orthoflavivirus* en aves silvestres

5.1 Cálculo del tamaño mínimo de muestra

Se realizó el cálculo del tamaño mínimo de muestra usando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 P(1-P)}{d^2}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra

Z = Estadístico Z para un nivel de confianza al 95% (*Z* = 1.96)

P = Prevalencia estimada o conocida (*P* = 0.08) (Chaves *et al.*, 2016).

d = precisión, con un error del 7 % (*d* = 0.07)

5.2 Extracción de ácidos nucleicos.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Usando el equipo QIAcube Connect QIAGEN (Número de catálogo 9002864), se realizó la extracción del material genético a partir de 140 µl de las muestras de hisopado cloacal, con el kit QIAamp Viral RNA, QIAGEN ® (Número de catálogo 52904), siguiendo el protocolo del fabricante.

5.3 RT-PCR anidada

A partir del RNA extraído, se realizó la técnica de RT-PCR anidada en punto final para la amplificación de un fragmento conservado del gen NS5 para la detección del género Orthoflavivirus, basado en una modificación del protocolo reportado por (Vázquez et al., 2012).

El protocolo se describe a continuación:

La retrotranscripción y la primera reacción de síntesis se realizó utilizando el Kit QIAGEN OneStep RT-PCR®, ajustando a un volumen final de 12.5 µl. (Tabla 2). Como controles positivos se usó un aislado del Virus Zika donado por el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSTE, Ciudad de México y agua libre de nucleasas como control negativo. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 3 y los primers utilizados, así como como los fragmentos obtenidos en cada reacción se pueden observar en la tabla 4.

Tabla 2. Volúmen de los reactivos para la retrotranscripción y primera PCR (Modificado de Vázquez et al., 2012)

Reactivo	Volúmen / Reacción (µl)
QIAGEN OneStep RT-PCR 5X	2.5
dNTP MIX (10mM de cada dNTP)	0.5
Primer Foward (10µM)	1.5
Primer Reverse (10µM)	1.5
QIAGEN OneStep Enzime Mix	0.5
Templado ARN	1.25
Agua libre de nucleasas	4.75
Volúmen total de la reacción	12.5

Tabla 3. Condiciones de RT-PCR (Modificado de Vázquez et al., 2012)

	Temperatura	Tiempo
Ciclo inicial	50ºC	30 minutos (RT)
	95ºC	15 minutos (Activación inicial)
40 Ciclos	94ºC	1 minuto (Desnaturalización)
	54ºC	4 minutos (Alineamiento)
	72ºC	1 minuto 15 segundos (Elongación)
	72ºC	5 minutos (Extensión final)

Tabla 4. Primers utilizados y tamaño de los fragmentos obtenidos en ambas reacciones de síntesis de la RT-PCR anidada en punto final (Modificado de Vázquez et al., 2012)

Primer	Secuencia	Tamaño del fragmento obtenido
1NS5 Forward	GCATCTAYAWCAYNATGGG	1111 pb
1NS5 Reverse	CCANACNYNRTTCCANAC	
2NS5 Forward	GCNATNTGGTWYATGTGG	1019 pb
2ns5 Reverse	CATRTCTTCNGTNGTCATCC	

En la segunda amplificación se obtiene un fragmento de 1019 pb. A partir del ADN, usando el kit HotStarTaq Plus DNA Polymerase® (Número de catálogo 203605); se hizo una modificación reduciendo la cantidad de cebadores a la mitad (Tabla 5), mientras que las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. Volúmen de los reactivos para la segunda PCR (Modificado de Vázquez et al., 2012)

Reactivo	Volúmen / Reacción (µl)
10 X PCR Buffer	2.5
15 mM MgCl2	3.5
dNTP MIX (10mM de cada dNTP)	0.25
Primer Foward (10µM)	1.5
Primer Reverse (10µM)	1.5
HotStarTaq Plus DNA Polymerasa	0.13
Producto de amplificación de la primer PCR	1
Agua libre de nucleasas	14.62
Volúmen total de la reacción	25

Tabla 6. Condiciones de RT-PCR (Modificado de Vázquez et al., 2012)

	Temperatura	Tiempo
	95ºC	5 minutos (Activación inicial)
40 Ciclos	94ºC	1 minuto (Desnaturalización)
	54ºC	3 minutos (Alineamiento)
	72ºC	1 minuto 15 segundos (Elongación)
	72ºC	10 minutos (Extensión final)

- Electroforesis

Los productos obtenidos en la segunda amplificación se corrieron en gel de agarosa al 2% a 100 volts durante 60 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Thermo Scientific GeneRuler, Número de catálogo SM0241).

5.4 Secuenciación genética

A partir de los amplicones obtenidos con el tamaño esperado, se enviaron para su purificación y secuenciación por el método Sanger al laboratorio Macrogen Europe (Ámsterdam) con el fin de confirmar el resultado e identificar la variante viral de *Orthoflavivirus* identificada.

Las secuencias obtenidas se analizaron con datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), utilizando el programa Geneious Prime Ver. 2023.2 (Yun *et al.*, 2016; Dotmatics, 2023).

RESULTADOS

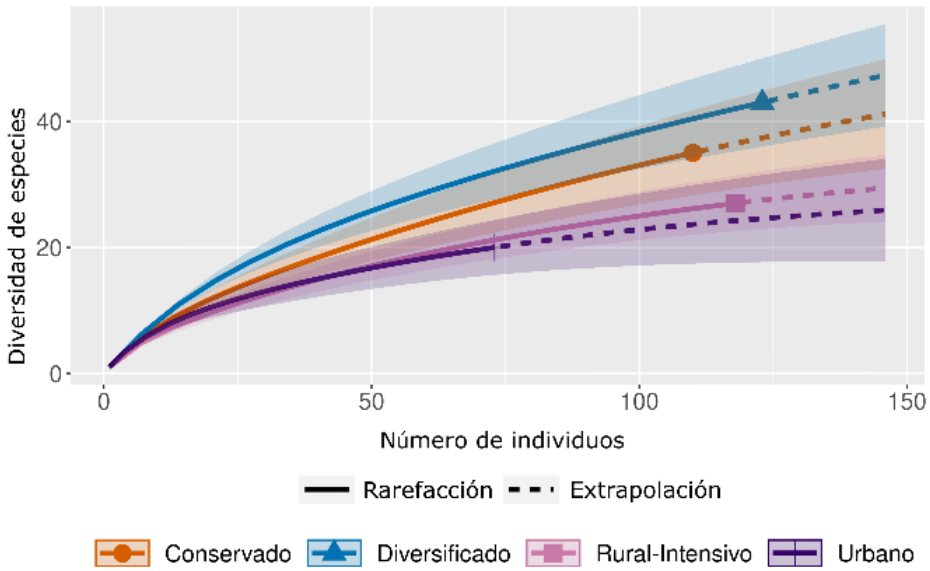
1.- Caracterización de las comunidades de aves silvestres

Riqueza específica

Se registraron un total de 424 aves distribuidas en los cuatro gradientes de uso de suelo pertenecientes a 10 órdenes, 24 familias, 62 géneros y 72 especies.

En el gradiente Diversificado (D) se registró la mayor riqueza con 43 especies y tuvo una abundancia absoluta de 123 individuos (Cobertura de muestreo (Ĉn) =80.55%), mientras que en el gradiente Conservado (C) y Rural de manejo intensivo (RI) se registraron 35 y 27 especies con abundancias de 110 y 118 individuos respectivamente (Ĉn= (C) 81.02%, (RI) 89.94%), por último, el gradiente Urbano (U) tuvo una riqueza de 20 especies y un registro de 73 individuos (Ĉn= 87.82%).

A



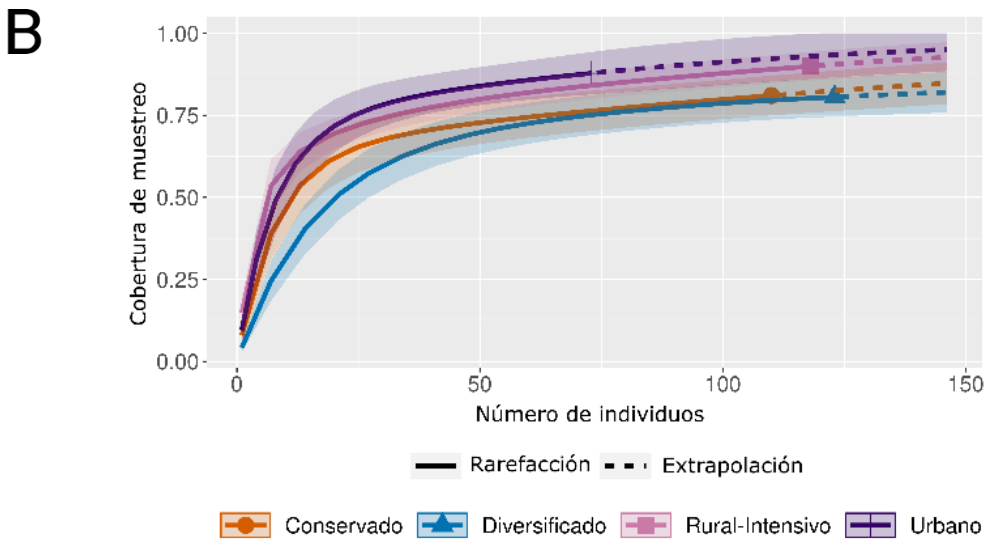


Fig 9. Curvas de rarefacción del número efectivo de especies (q=0) construida con base en el número de individuos y su cobertura de muestreo durante la temporada seca (junio-agosto 2022) y temporada de lluvias (abril-mayo 2023), para los gradientes Conservado (C), Diversificado (D), Rural de manejo intensivo (RI) y Urbano (U). A) Curva basada en el número de individuos y la riqueza de especies (q=0). B) Curva basada en el número de individuos y la cobertura de muestreo (porcentaje de individuos muestreados). Las curvas fueron extrapoladas hasta la abundancia total de 146 individuos. Las figuras se muestran en el formato que ofrece iNEXT: una porción interpolada u observada de la curva; un punto que marca la riqueza observada en cada gradiente, y una porción de la curva extrapolada a partir de la máxima riqueza y abundancia observadas en cada gradiente. Las bandas entorno a las curvas corresponden a los IC 95%.

En cuanto a la completitud del muestreo se obtuvo en el gradiente Diversificado un 45.26%, seguido del gradiente Conservado con 45.25% y el gradiente Urbano (U) con 68.97%, el gradiente que tuvo una mayor completitud fue el gradiente Rural de manejo intensivo (RI) con 77.14%, los datos de completitud, así como de cobertura de muestreo se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Medidas de evaluación del muestreo por cada gradiente de uso de suelo (q=0=Riqueza, Ĉn=Cobertura de muestreo)

Gradiente	q=0 Observada	q=0 Estimada	Completitud	Ĉn
Conservado	35	64	54.69%	81.03%
Diversificado	43	95	45.26%	80.55%
Rural-Intensivo	27	35	77.14%	89.95%
Urbano	20	29	68.97%	87.82%

Para realizar la comparación de la diversidad se utilizaron los datos bajo una cobertura de muestreo similar aproximada al 82%, en donde se extrapolan los datos de los gradientes Conservado y Diversificado y se interpolan los datos de los gradientes Rural de manejo intensivo y Urbano Fig. 10. Se aprecia una diferencia significativa entre la diversidad del gradiente Diversificado con el Rural de manejo intensivo y el Urbano, pero no así con el Conservado, además entre estos últimos tres no existió una diferencia significativa entre su diversidad.

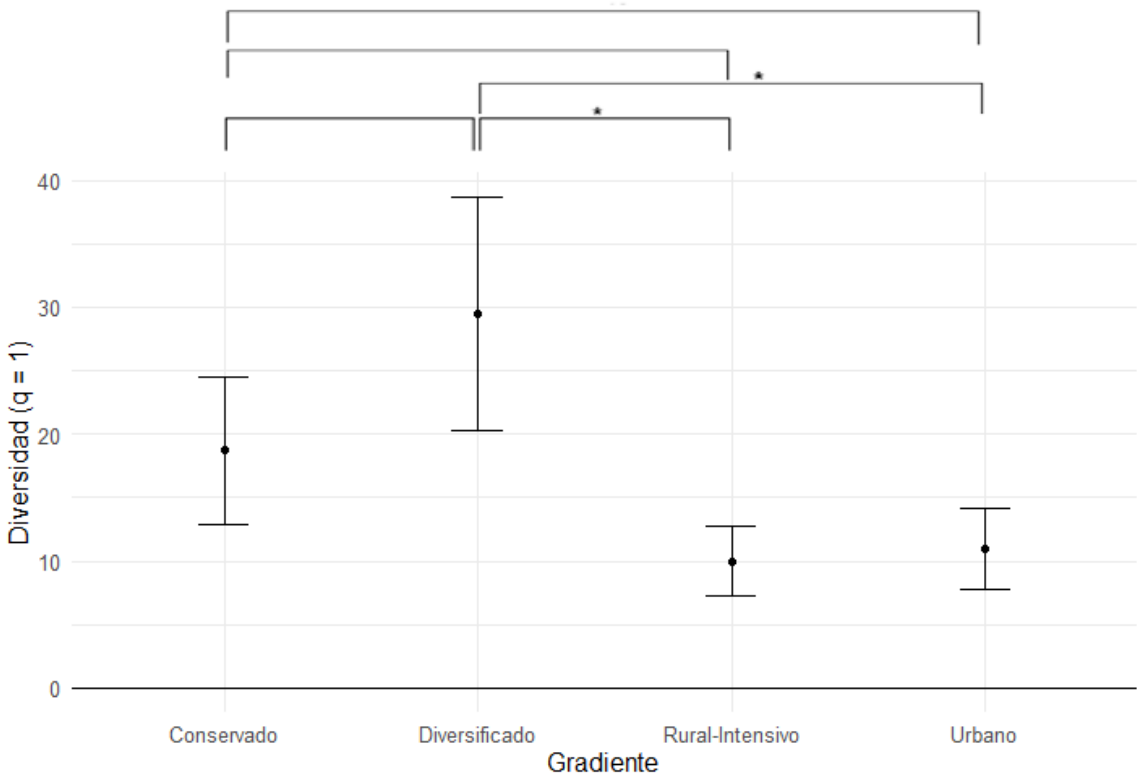


Fig 10. Comparación de la diversidad de especies (q1) de aves silvestres en los cuatro gradientes de muestreo durante la temporada seca (junio-agosto 2022) y temporada de lluvias (abril-mayo 2023). La comparación entre gradientes se representa con una línea que los conecta, los gradientes que tuvieron una diferencia significativa entre su diversidad (q=1) presentan un asterisco (*) sobre la línea de comparación.

A pesar de no existir diferencias significativas entre los demás gradientes, la magnitud de la diferencia (MD) difirió entre las estimaciones de diversidad (q=0 ± IC 95%) de los cuatro gradientes, el análisis de la MD sugiere que el gradiente Conservado (C) presentó una riqueza alrededor del 36% menor a la del gradiente diversificado (D), y aproximadamente 40% mayor a la registrada en el gradiente Rural de manejo intensivo (RI) y el gradiente Urbano (U) (C vs RI = 46.63%, C vs U = 41.39%) aún sin presentar una diferencia significativa. Por el otro lado existe una MD menor al 10% entre el gradiente Rural de manejo intensivo (RI) y el gradiente Urbano (U) (RI vs U = 8.94%).

Abundancia relativa

Se realizaron curvas de rango abundancia para analizar la abundancia relativa en cada gradiente. En la figura 11 se pueden observar las curvas resultantes.

De manera cualitativa se puede analizar las diferencias en las pendientes de cada gráfica, al existir una relación inversa entre la equitatividad de las comunidades y la pendiente. Además del análisis cualitativo de las curvas de rango abundancia se usaron los valores obtenidos de la diversidad de orden 2 (q = 2) que corresponde con el inverso del índice de Simpson. Bajo esos dos criterios se observa que la comunidad con mayor dominancia de pocas especies es la del gradiente Rural de Manejo intensivo ((q = 2) 6.15), siendo que dos especies, *Columbina talpacoti* y *Turdus Grayi*, representan aproximadamente el 50% de todos los individuos registrados, lo que indica una dominancia de estas especies en la comunidad.

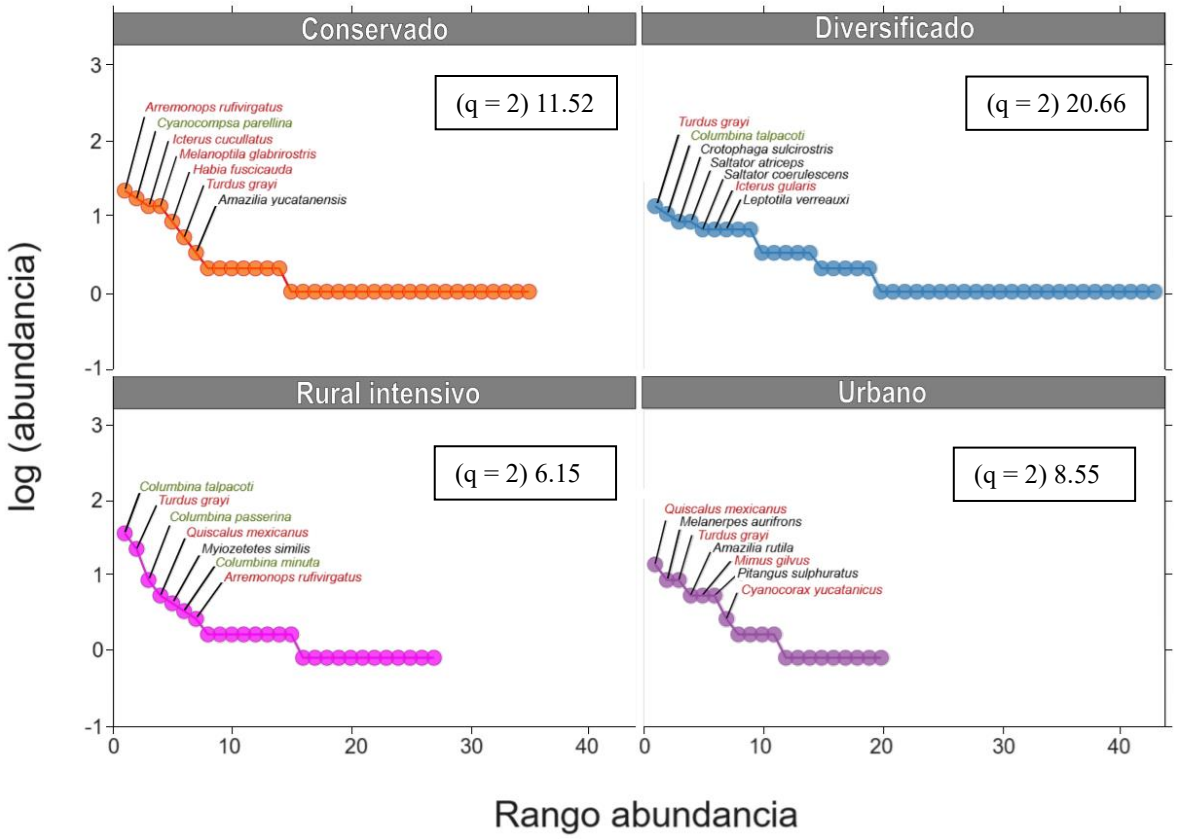


Fig. 11 Curvas de rango abundancia de las comunidades de aves en cada gradiente de muestreo durante la temporada seca (junio-agosto 2022) y temporada de lluvias (abril-mayo 2023). Las especies consideradas como reservorias para *Orthoflavivirus* se encuentran resaltadas en color rojo, aquellas consideradas posibles reservorias están resaltadas en color verde. El inverso del índice de Simpson (Diversidad de orden 2 q = 2) se muestra en rectángulos para cada comunidad.

Por otro lado, los gradientes Conservado y Urbano exhibieron una distribución de la abundancia similar ((q = 2) 11.2 y 8.55 respectivamente). En estas comunidades, cuatro especies (C: *Arremonops rufivirgatus, Cyanocompsa parellina, Icterus cucullatus, Melanoptila glabrirostris;* U*: Quiscalus mexicanus, Melanerpes aurifrons, Turdus grayi, Amazilia rutila*) albergaban un poco más del 50% de los individuos totales.

Finalmente, el gradiente Diversificado mostró la menor dominancia ((q = 2) 20.66) esto indica que, en esta comunidad, la distribución de la abundancia entre las especies es más uniforme, con una menor dominancia por parte de unas pocas especies.

De igual forma se graficó la abundancia relativa de reservorios y posibles reservorios de las comunidades. De las 73 especies analizadas, 23 son consideradas reservorias y/o posibles reservorias.

Los resultados de la abundancia relativa por localidad se pueden ver en la Figura 12. La comunidad de aves de la localidad del gradiente Urbano muestra una mayor abundancia relativa de reservorios, seguida de la comunidad Conservado, Rural de manejo intensivo y finalmente Diversificado.

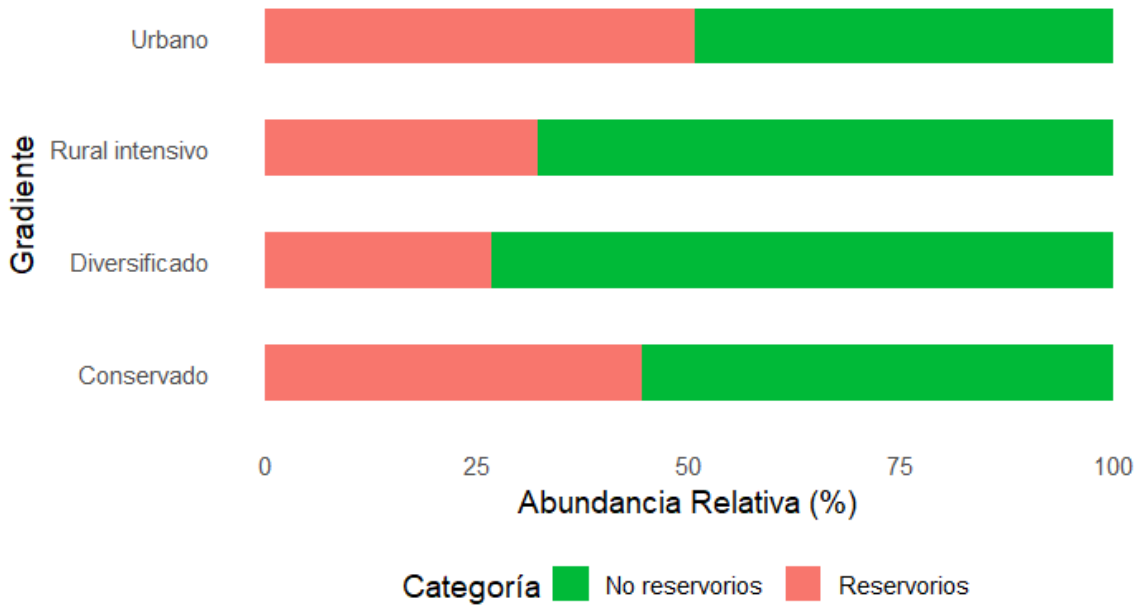


Fig. 12 Abundancia relativa de los individuos considerados reservorios y no reservorios por gradiente uso de suelo durante la temporada seca (junio-agosto 2022) y temporada de lluvias (abril-mayo 2023).

2.- Determinación del estatus reservorio

De los individuos registrados, 280 fueron clasificados de acuerdo con los criterios establecidos en tres categorías: reservorios confirmados (156 individuos), posibles reservorios (104 individuos) e individuos sin estudios previos sobre su estatus como reservorios (20 individuos). Dentro de las 14 especies identificadas como reservorios confirmados, 13 pertenecieron al orden Passeriformes mientras que *Glaucidium brasilianum* fue la única especie clasificada en esta categoría dentro del orden Strigiformes.

En cuanto a las 10 especies consideradas como posibles reservorios 7 pertenecieron al orden Passeriformes, mientras que 3 correspondieron al orden de los Columbiformes.

Por otro lado, se identificaron 13 especies sin antecedentes documentados sobre su papel como reservorios de *Orthoflavivirus*. Todas ellas pertenecieron al orden Passeriformes y, a diferencia de las especies clasificadas en las categorías previas, se caracterizaron por presentar hábitos migratorios. Un resumen detallado de la clasificación y las especies identificadas se puede observar en la tabla 8.

Tabla 8. Resúmen de las especies analizadas por PCR para la detección de *Orthoflavivirus* , se muestran las especies analizadas y su respectivo número de muestras por gradiente

Orden	Familia	Especie	Estatus reservorio	Estacionalidad
Passeriformes	*Cardinalidae*	*Habia fuscicauda*	Reservorio (Owen, 2012)	Se reproduce, residente permanente
	Corvidae	*Cyanocorax yncas*	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
		Cyanocorax yucatanicus	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
	Icteridae	*Amblycercus holosericeus*	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
		Icterus autarus	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
		Icterus cucullatus	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
		Icterus gularis	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
		Molothrus aeneus	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
		Quiscalus mexicanus	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
	Mimidae	*Dumetella carolinensis*	Reservorio (Dusek, 2009)	Residente de invierno
		Mimus gilvus	Reservorio (Dusek, 2009)	Se reproduce, residente permanente
	Passerellidae	*Arremonops rufivirgatus*	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
	Turdidae	*Turdus grayi*	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
Strigiformes	*Strigidae*	*Glaucidium brasilianum*	Reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
Passeriformes	*Cardinalidae*	*Cardinalis cardinalis*	Posible reservorio (Owen, 2012)	Se reproduce, residente permanente
		Cyanocompsa parellina	Posible reservorio (Owen, 2012)	Se reproduce, residente permanente
		Passerina caerulea	Posible reservorio (Owen, 2012)	Residente de invierno
		Passerina cyanea	Posible reservorio (Owen, 2012)	Residente de invierno
	Icteridae	*Dives dives*	Posible reservorio (Tolsá, 2018)	Se reproduce, residente permanente
	Mimidae	*Melanoptila glabrirostris*	Posible reservorio (Dusek, 2009)	Se reproduce, residente permanente
		Mimus polyglottos	Posible reservorio (Dusek, 2009)	Se reproduce, residente permanente
Columbiformes	*Columbidae*	*Columbina minuta*	Posible reservorio	Se reproduce, residente permanente
		Columbina passerina	Posible reservorio	Se reproduce, residente permanente
		*Columbina talpacoti**	Posible reservorio	Se reproduce, residente permanente
Passeriformes	*Hirundinidae*	*Hirundo rustica*	Sin estudiar	Transeunte
		Stelgidopteryx serripennis	Sin estudiar	Residente de invierno
	Parulidae	*Geothlypis formosa*	Sin estudiar	Residente de invierno
		Parkesia motacilla	Sin estudiar	Transeunte/poblacion pequeña en invierno
		Protonotaria citrea	Sin estudiar	Transeunte/poblacion pequeña en invierno
		Setophaga petechia	Sin estudiar	Residente de invierno
		Setophaga ruticilla	Sin estudiar	Residente de invierno
	Vireonidae	*Cyclarhis gujanensis*	Sin estudiar	Se reproduce, residente permanente
		Vireo griseus	Sin estudiar	Residente de invierno
		Vireo olivaceus	Sin estudiar	Transeunte/poblacion pequeña en invierno
		Vireo pallens	Sin estudiar	Se reproduce, residente permanente
		Vireo philadelphicus	Sin estudiar	Residente de invierno
		Vireo sp	Sin estudiar	Variable

2. Detección molecular de *Orthoflavivirus*

Del total de las 424 aves registradas, se analizaron un total de 280 muestras de hisopados cloacales de aves pertenecientes a los cuatro gradientes de uso de suelo, clasificadas como: reservorios, posibles reservorios o individuos sin análisis registrado en la literatura, mediante la técnica de RT-PCR anidada en punto final.

Basado en el cálculo del tamaño mínimo de muestra, se seleccionaron al menos 58 muestras por gradiente exceptuando el urbano, en donde solamente se contaban con 39 muestras pertenecientes a individuos reservorios, posibles reservorios o individuos sin análisis de su estatus reservorio en la literatura. Para el resto de los gradientes, se analizaron el número mínimo de muestras y, adicionalmente, aquellas muestras excedentes disponibles (Tabla 9.)

Tabla 9. Número de muestras analizadas por cada categoría de gradiente y su estatus reservorio

Hábitat	Reservorios	Posibles reservorios	Sin estudiar	Total
Conservado	49	30	7	86
Diversificado	32	20	9	61
Rural de manejo intensivo	38	52	4	94
Urbano	37	2	0	39

Como resultado de la segunda reacción de síntesis solamente una muestra presentó banda con el peso molecular aproximado de 1019 pb (sugerente a la presencia de *Orthoflavivirus*) (Fig. 13), perteneciente a la especie *Columbina talpacoti* (TMA236). Las características ecológicas de esta especie se pueden observar en la tabla 8, señalizada con un asterisco.

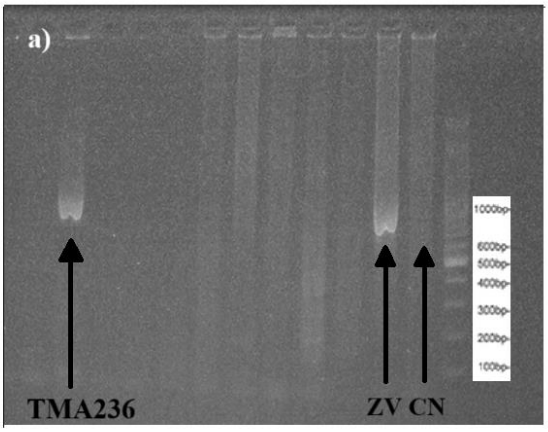


Fig. 13 Gel de agarosa al 2%, el marcador de peso molecular de 100 pb se puede observar en la última banda, a la izquierda se muestran el control negativo (CN) y el control positivo (ZV). a) Se observa la muestra positiva (TMA236) con un peso molecular de 1019 pb. b) Gel con la muestra positiva (COA627) con un peso molecular de 1019 pb).

3.Secuenciación genética

El amplicón de la muestra (TMA236) así como el control positivo (Zika Virus) fue enviado para su secuenciación genética al laboratorio Macrogen Europe (Ámsterdam).

La secuencia obtenida de la muestra (TMA236) y el control positivo fueron analizados mediante un alineamiento local de nucleótidos con la herramienta en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI Los resultados indicaron que se comparte el 100 % de identidad con la secuencia de referencia de (Ref.Num KX377337) Zika Virus reportada.

Así mismo se realizó un alineamiento entre las secuencias para descartar contaminación. Los resultados indicaron un porcentaje de identidad entre un 99.09% y 100%, confirmándose así que se trataba de la misma secuencia (Fig 14 y 15).

Fig. 14. Alineamiento de las secuencias genéticas de la muestra positiva (SEQ_236), el control positivo (ZIKA_CONTROL) y la secuencia de referencia (KX377337) del virus Zika obtenidas con el programa Geneious Pime Ver.2023.2. Se puede observar la alta similitud que existe entre la muestra analizada y el control positivo.

	KX377337	ZIKA_CONT...	SEQ_236
KX377337		100%	99.09%
ZIKA_CONTROL	100%		99.09%
SEQ_236	99.09%	99.09%	
SEQ_627	99.88%	100%	99.09%

Fig. 15. Matriz de distancia obtenida a partir del alineamiento de las secuencias de la muestra positiva (SEQ_236) el control positivo (ZIKA_CONTROL) y una secuencia de referencia (KX377337) obtenidas con el programa Geneious Pime Ver.2023.2. Se muestran los porcentajes de identidad entre cada una de las secuencias obtenidas.

Debido a estos resultados, se sospechó de una contaminación del control positivo a la muestra durante el procesamiento en el laboratorio. Por lo que el análisis se realizó nuevamente, iniciando desde la extracción del material genético a partir del lote de muestras correspondiente a la corrida en la que se detectó el falso positivo. Tal como se observa en la Fig. 16 en esta repetición del análisis no se obtuvieron muestras con bandas en el peso molecular esperado para *Orthoflavivirus* tras la segunda reacción de síntesis.

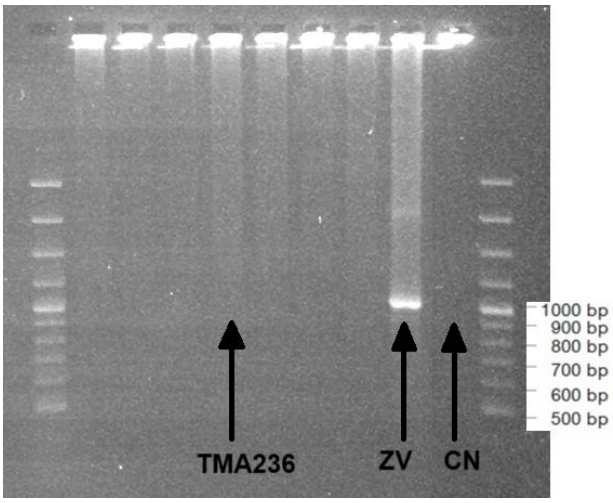


Fig. 16 Gel de agarosa al 2%. El marcador de peso molecular de 100 pb se puede observar en la última banda, a la izquierda se muestran el control negativo (CN) y el control positivo (ZV). a) Se señala con una flecha la muestra falsa positiva (TMA236) sin presentar bandas en esta ocasión.

DISCUSIÓN

Este estudio analiza en el contexto de la creciente incidencia de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, impulsadas en gran medida por cambios antropogénicos (Murray and Daszak, 2013). La búsqueda de *Orthoflavivirus* en aves silvestre en el estado de Yucatán aporta información sobre la dinámica de circulación de estos virus en la región, analizando el papel que desempeña el paisaje y principalmente el uso de suelo sobre la abundancia y riqueza de especies que pueden servir como hospederos de patógenos zoonóticos, principalmente en zonas y comunidades que presentan cambios en el uso de suelo y en las que no se ha explorado la circulación de estos virus en las comunidades bióticas.

De acuerdo con los resultados, en los cuatro gradientes de estudio (Conservado, Diversificado, Rural de Manejo intensivo y Urbano), se observó una variabilidad en la riqueza de especies y su abundancia. Los gradientes Conservado y Diversificado mostraron mayor riqueza específica y abundancia relativa, mientras que el rural de manejo intensivo y el urbano registraron los valores más bajos en ambos parámetros de la diversidad. El contraste que se observa entre la alta riqueza y equitatividad de especies en los gradientes Conservado y Diversificado en comparación con la baja riqueza y alta dominancia de especies consideradas como susceptibles a los *Orthoflavivirus* en los gradientes rural de manejo intensivo y urbano destaca los efectos del cambio de uso de suelo sobre la estructura de las comunidades de aves. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que documentan como la pérdida de áreas naturales, derivada de la urbanización y la

agricultura, reduce la diversidad biológica y altera la estructura de las comunidades tal y como se observa en los gradientes Rural de manejo intensivo y Urbano que en comparación con los gradientes Conservado y Diversificado, cuentan con un mayor porcentaje de vegetación inducida y asentamientos urbanos (Murray and Daszak, 2013; Keesing and Ostfeld, 2021; Platto et al., 2021).

A partir de la clasificación de las especies de acuerdo con su estatus reservorio para *Orthoflavivirus* se observó que el mayor registro de individuos considerados como reservorios se obtuvo en el gradiente Urbano, lo cual remarca la capacidad de estas aves (principalmente Passeriformes) de adaptarse y agregarse en estos entornos, aumentando el riesgo de transmisión a humanos en las zonas urbanas o periurbanas (Bradley, Gibbs and Altizer, 2008; Keesing *et al.*, 2010; Tavares *et al.*, 2024).

Por otro lado, a pesar de la alta riqueza y abundancia de especies en la comunidad del gradiente Conservado, se observó una elevada abundancia de especies reservorias de *Orthoflavivirus.* Estos resultados destacan la relevancia de estos ambientes en la ecología y mantenimiento de posibles reservorios de *Orthoflavivirus.* En este contexto, las alteraciones en la estructura de las comunidades de aves en este gradiente Conservado podrían influir en la dinámica de interacción patógeno-vector-hospedero, afectando así la circulación viral en la zona (Keesing et al., 2010; Ostfeld and Keesing, 2012; Keesing and Ostfeld, 2021).

Mediante el análisis de RT-PCR anidada se obtuvo una muestra considerada como sospechosa, perteneciente a *Columbina Talpacoti* una especie residente permanente y considerada en este estudio como un posible reservorio de

Orthoflavivirus de acuerdo con la clasificación realizada. Al repetir el análisis no se comprobó la presencia del material genético de los *Orthoflavivirus,* impidiendo cumplir con el tercer objetivo específico de este estudio. Sin embargo, la falta de individuos positivos a la presencia de *Orthoflavivirus*, en este estudio, puede deberse, tal y como lo describe Tavares et al. (2024), a cuestiones como la estructuración de la comunidad de hospederos, la densidad de mosquitos portadores del virus y los factores abióticos del ambiente. Ezenwa et al. (2006), describe una correlación negativa entre la riqueza de especies no Passeriformes y la prevalencia de *Orthoflavivirus* en mosquitos y humanos, en este estudio, si bien la mayoría de especies muestreadas pertenecen a este orden, se observó que aquellas identificadas en la literatura como no reservorios competentes fueron más abundantes en los cuatro gradientes analizados en comparación con las especies reconocidas como reservorios competentes. Este hallazgo sugiere una reducción en la tasa de contacto entre los vectores y los reservorios competentes, lo que podría contribuir a una baja circulación de *Orthoflavivirus* en las áreas muestreadas, consistente con el efecto de dilución, descrito en otros sistemas ecológicos (Civitello et al., 2015; Keesing and Ostfeld, 2021) . No obstante, para establecer correlaciones más robustas, es fundamental continuar con el muestreo de aves en la región y aumentar el porcentaje de completitud, de manera que se incluyan la mayoría de las especies presentes. En este estudio, la completitud del muestreo osciló entre el 40% y el 70%, por lo que idealmente en estudios futuros es alcanzar al menos el 80% de representación de las especies de aves.

De acuerdo con algunos autores, otros factores que podrían explicar la ausencia de detección del género viral buscado, son los aspectos particulares de los vectores, la posible inmunidad adquirida en las poblaciones de aves residentes, así como las limitaciones asociadas a la detección molecular, incluyendo la ventana de detección del virus en las muestras analizadas (Ezenwa *et al.*, 2007; Casades-Martí *et al.*, 2023). Dentro de las propiedades de los vectores que influyen en la prevalencia de *Orthoflavivirus* en las aves se encuentra la densidad de mosquitos y la prevalencia viral en estos (Ezenwa *et al.*, 2006; Ferraguti *et al.*, 2021). La densidad de los mosquitos influye fuertemente en la tasa de interacción entre hospedero-vector, siendo así que en ambientes donde la tasa de interacción entre vectores y reservorios es elevada, a pesar de contar con una alta diversidad y riqueza de aves, la transmisión de *Orthoflavivirus* se puede mantener activa y la prevalencia de las enfermedades aumentar, de manera contraria si la tasa de interacción es baja, aunque exista una baja riqueza y abundancia de aves (como en las localidades de los gradientes Rural de manejo intensivo y Urbano) se verán reducidas las oportunidades de transmisión (Komar *et al.*, 2003; Deardorff *et al.*, 2006; Ferraguti *et al.*, 2021). En el trabajo realizado por García-Suárez et al. (2024) se puede observar la variabilidad en la densidad de mosquitos en el estado de Yucatán a lo largo del año, siendo los meses entre noviembre y mayo la temporada que cuenta con una baja densidad de vectores, lo que podría reducir la tasa de interacción entre reservorios y vectores durante la época de secas, sin embargo, en la época de lluvias la densidad de mosquitos es mayor. Debido a estas variaciones, es importante considerar en estudios posteriores en la región, los factores asociados a los vectores que modifiquen la tasa de interacción entre reservorios-vector-

patógeno con el fin de comprender de manera integral la dinámica de los *Orthoflavivirus* en Yucatán (Chao & Jost, 2012; Ferraguti et al., 2021).

La inmunidad adquirida por la exposición previa a *Orthoflavivirus* nativos en la región es un factor relevante que puede afectar los resultados de detección mediante métodos moleculares en las comunidades de aves (Ahlers and Goodman, 2018). Aunque este efecto ha sido mejor descrito entre virus del mismo serogrupo como el Virus del Oeste del Nilo y el Virus de la Encefalitis Japonesa, estudios experimentales también han documentado protección cruzada contra el Virus del Oeste del Nilo en individuos previamente expuestos a otros *Orthoflavivirus* como el Zika Virus (Vázquez-Calvo *et al.*, 2017) . Esta evidencia subraya la importancia de complementar los análisis en la región con estudios serológicos, con el fin de evaluar si existe una inmunidad específica contra virus como el Virus del Oeste del Nilo, el Virus de la Encefalitis de San Luis o inmunidad cruzada por la previa exposición de otros *Orthoflavivirus* como el Zika.

Dentro de los factores asociados a la metodología de detección, la ausencia de *Orthoflavivirus* circulantes en las localidades durante el tiempo de muestreo podría explicarse por dos cuestiones generales. En primer lugar, se puede considerar la temporalidad en la circulación de *Orthoflavivirus*, si bien se efectuaron muestreos en dos épocas diferentes del año (temporada de lluvias y secas) el tiempo del muestreo en relación con el resto del año representa solo una pequeña fracción del periodo en el que podría detectarse algún virus.

El tamaño de muestra es otro factor fundamental a considerar. Para su cálculo se estableció un margen de error del 7% con el fin de obtener un tamaño mínimo de

muestra alcanzable, manteniendo un intervalo de confianza al 95% y utilizando la prevalencia reportada por Chaves et al. (2016), resultando en 58 muestras por gradiente de estudio. Aunque este número podría haber sido aplicado a cada especie para aumentar la probabilidad de detección, la abundancia de aves en las zonas muestreadas no lo permitió. Así mismo al ajustar la fórmula con un margen de error del 5%, el tamaño mínimo de muestra obtenido asciende a 110, sin embargo, la selección de este tamaño de muestra por especie resulta inviable, debido a que ninguna cuenta con esa abundancia absoluta en las localidades de muestreo, considerar este número por gradiente es posible, sin embargo, se incluirían especies no reservorias de *Orthoflavivirus* y con baja importancia en su ciclo de transmisión. Los muestreos realizados alcanzaron una cobertura de muestreo superior al 80%, bajo este contexto se ha garantizado la representación de las especies más abundantes y con mayor participación en la transmisión de *Orthoflavivirus* en cada gradiente, un aumento en la cantidad de individuos analizados solo añadiría aquellos pertenecientes a especies poco comunes y con menor relevancia en el ciclo de transmisión de *Orthoflavivirus*.

Adicional a lo anterior, la técnica de PCR, aunque es altamente sensible, presenta una ventana de detección limitada. Considerando la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por *Orthoflavivirus* transmitidos por mosquitos del clado *Culex,* el periodo de viremia durante el cual el virus puede ser detectado mediante métodos moleculares es de entre 10 y 12 días; en otros estudios se ha observado que la excreción viral por medio de secreciones cloacales puede continuar entre 5-7 días posterior al periodo de viremia, lo que resulta en una ventana de detección

promedio de 15-19 días postinfección (Komar *et al.*, 2003). Por lo que se propone que para evaluar con mayor precisión la situación de la circulación de *Orthoflavivirus* en estas comunidades, es necesario complementar el análisis mediante estudios serológicos que permitan determinar si las aves han estado en contacto con estos patógenos.

La ausencia de la presencia del material genético de Orthoflavivirus mediante la detección molecular en este estudio contrasta con reportes previos que han identificado *Orthoflavivirus* como el Virus del Oeste del Nilo (VON) y el Virus de la Encefalitis de San Luis (VESL) en aves de la región de la península de Yucatán mediante serología y PCR (Farfán-Ale *et al.*, 2004; Chaves *et al.*, 2016). Sin embargo, dichos estudios no incluyen estrategias de secuenciación genómica, lo que podría limitar la confirmación de la identidad del *Orthoflavivirus* circulante.

Los resultados falsos positivos bajo esta y otras técnicas son un factor común a considerar. La técnica de PCR anidada realiza una doble amplificación de los productos de ADN aumentando la sensibilidad y especificidad, sin embargo, el riesgo de contaminación en la manipulación es mayor, por ello es crucial emplear herramientas de confirmación con el propósito de evitar falsos positivos (Borst, Box and Fluit, 2004; Shen, 2019)

El resultado falso positivo fue confirmado mediante la secuenciación de los amplicones obtenidos con lo que se reiteró la contaminación con el control positivo durante el procesamiento. Se repitió el procesamiento verificando las medidas de bioseguridad y el manejo de los controles positivos, resultando en negativos por PCR.

A pesar de que no se detectó la presencia de *Orthoflavivirus* en las muestras analizadas, este estudio aporta información valiosa sobre la estructura de las comunidades de aves en diferentes gradientes de uso de suelo en Yucatán, destacando cómo la pérdida de biodiversidad y la transformación del paisaje influyen en la dinámica de enfermedades zoonóticas. La presencia de especies reservorias en áreas conservadas y su adaptación a entornos alterados subraya la importancia de mantener las dinámicas en los ecosistemas y del monitoreo continuo de la circulación viral. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de implementar prácticas agropecuarias sostenibles y estrategias de conservación que mitiguen el riesgo de brotes, protegiendo tan la salud humana como la biodiversidad local (Bradley, Gibbs and Altizer, 2008; Casades-Martí *et al.*, 2023).

CONCLUSIONES

El creciente interés socioeconómico en la península de Yucatán ha provocado un cambio drástico de los ambientes naturales en áreas destinadas al aprovechamiento agropecuario y al desarrollo urbano, esta tendencia, acorde al patrón nacional, probablemente continuará en aumento. Los resultados obtenidos confirman que el tipo de uso de suelo influye significativamente en la estructura de las comunidades de aves y en la prevalencia de *Orthoflavivirus* en Yucatán. Se demostraron los efectos del creciente cambio en el uso de suelo en el estado de Yucatán sobre la estructura de las comunidades de aves, reflejado en la disminución en la diversidad conforme se reduce la vegetación nativa y aumenta la densidad poblacional humana. Los resultados observados, particularmente del gradiente diversificado, sugieren que es posible el aprovechamiento de áreas naturales y el paisaje sin reducir significativamente la diversidad de especies silvestres a través de la conservación parcial de las áreas naturales (40% de vegetación nativa), reduciendo el impacto de la pérdida de la biodiversidad en la emergencia y reemergencia de enfermedades zoonóticas.

Aunque no se detectaron *Orthoflavivirus* en los individuos muestreados, la presencia de aves que actúan como reservorios o posibles reservorios, así como los cambios en su abundancia y riqueza en respuesta a la modificación del paisaje, resaltan la importancia de reducir las alteraciones abruptas en el entorno y seguir con los monitoreos tanto de agentes infecciosos como de los hospederos. Así mismo, subrayan la necesidad de continuar con el monitoreo de *Orthoflavivirus* de

manera longitudinal a lo largo del año en la región y completar estos análisis con estudios serológicos para tener una perspectiva integral de la situación de estos virus, con el fin de prevenir posibles y establecer estrategias de acción inmediata en respuesta a un incremento en la incidencia de enfermedades ocasionadas por *Orthoflavivirus* en la población humana.

REFERENCIAS

Ahlers, L.R.H. and Goodman, A.G. (2018) ‘The immune responses of the animal hosts of West Nile virus: A comparison of insects, birds, and mammals’, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00096.

Badii, M.H. *et al.* (2015) ‘Pérdida de Biodiversidad: Causas y Efectos’, *Daena: International Journal of Good Conscience*, 10(2), pp. 156–174. Available at: http://plato.stanford.edu/entries/.

Berlanga, H. and Rodríguez, V. (2010) ‘Las aves migratorias: a prueba de muros’, *ESPECIES*, pp. 16–23.

Blitvich, B.J. (2008) ‘Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus.’, *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, pp. 71–86. Available at: https://doi.org/10.1017/S1466252307001430.

Borst, A., Box, A.T.A. and Fluit, A.C. (2004) ‘False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: Suggestions for a prevent and destroy strategy’, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, pp. 289–299. Available at: https://doi.org/10.1007/s10096-004-1100-1.

Bradley, C.A., Gibbs, S.E.J. and Altizer, S. (2008) ‘Urban land use predicts west Nile virus exposure in songbirds’, *Ecological Applications*, 18(5), pp. 1083–1092. Available at: https://doi.org/10.1890/07-0822.1.

Cardozo, F. *et al.* (2023) ‘Detection of neutralizing antibodies against flaviviruses in free-ranging birds, Paraguay (2016–2018)’, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 117(1), pp. 61–63. Available at: https://doi.org/10.1093/trstmh/trac067.

Carrillo, G. and Viviana, M.R. (2014) ‘MEDICINA DE LA CONSERVACIÓN, ECOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES Y LA MEDICINA VETERINARIA’, *CONEXION AGROPECUARIA*, 4(1), pp. 51–56.

Casades-Martí, L. *et al.* (2023) ‘Risk Factors for Exposure of Wild Birds to West Nile Virus in A Gradient of Wildlife-Livestock Interaction’, *Pathogens*, 12(1). Available at: https://doi.org/10.3390/pathogens12010083.

Centers for Disease Control and Prevention (2010) *Morbidity and Mortality Weekly Report Editorial and Production Staff*. Available at: www.cdc.gov/mmwr.

Chao, A., Gotelli, N.J. and Hsieh, T.C. (2016) *iNEXT (iNterpolation and EXTrapolation) Online: Software for Interpolation and Extrapolation of Species Diversity. Program and User’s Guide*. Available at: http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/inext-online/.

Chao, A. and Jost, L. (2012) ‘Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size’, *Ecology*, 93(12), pp. 2533–2547. Available at: https://doi.org/10.1890/11-1952.1.

Chaves, A. *et al.* (2016) ‘West nile virus in resident birds from yucatan, Mexico’, *Journal of Wildlife Diseases*, 52(1), pp. 159–163. Available at: https://doi.org/10.7589/2015-02-046.

Civitello, D.J. *et al.* (2015) ‘Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(28), pp. 8667–8671. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1506279112.

Comisión Nacional Forestal (2022) *Deforestación*, *Gobierno de México*. Available at: https://snmf.cnf.gob.mx/deforestacion/ (Accessed: 20 January 2024).

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2023) *La biodiversidad en Yucatán: Estudio de Estado*. Available at: https://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/estudios/ee_yucatan (Accessed: 6 September 2023).

Cortés-Ramírez, G., Gordillo-Martínez, A. and Navarro-Sigüenza, A.G. (2012) ‘Biogeographical patterns of the Yucatán Peninsula birds’, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, pp. 530–542.

Cultid-Medina, C. and Escobar, F. (2019) ‘Pautas para la estimación y comparación estadística de la diversidad biológica (q D)’, in *La biodiversidad en un mundo cambiante: Fundamentos teóricos y metodológicos para su estudio.* Ciudad de México: Universidad Autónoma de Hidalgo, pp. 175–202.

Cumming, G. (2007) *Inference by Eye: Pictures of Confidence Intervals and Thinking About Levels of Confidence*, *Teaching Statistics*.

Davidson, A.D. (2009) ‘New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5’, in *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 41–101. Available at: https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)74002-3.

Deardorff, E. *et al.* (2006) *Introductions of West Nile Virus Strains to Mexico*. 2. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3373085/pdf/05-0871.pdf (Accessed: 3 November 2023).

Díaz, L.A. *et al.* (2011) 'VIRUS WEST NILE EN ARGENTINA: UN AGENTE INFECCIOSO EMERGENTE QUE PLANTEA NUEVOS DESAFÍOS', *Hornero*, 26(1), pp. 5–28.

Dirección General de Epidemiología (2023) *Boletín EPIDEMIOLÓGICO*. 35. Ciudad de México. Available at: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/856015/sem35.pdf (Accessed: 12 September 2023).

Diuk-Wasser, M.A., Vanacker, M.C. and Fernandez, M.P. (2021) 'Impact of Land Use Changes and Habitat Fragmentation on the Eco-epidemiology of Tick-Borne Diseases', *Journal of Medical Entomology*, 58(4), pp. 1546–1564. Available at: https://doi.org/10.1093/jme/tjaa209.

Dong, H. *et al.* (2014) 'Flavivirus RNA methylation', *Journal of General Virology*. Society for General Microbiology, pp. 763–778. Available at: https://doi.org/10.1099/vir.0.062208-0.

Dotmatics (2023) 'Geneious Prime'. Available at: http://www.geneious.com/ (Accessed: 30 January 2025).

Egloff, M.-P. *et al.* (2002) 'An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization', *The EMBO Journal*, 21(11), pp. 2757–2768. Available at: https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2757.

Ellis, E.A. and Porter-Bolland, L. (2008) 'Is community-based forest management more effective than protected areas?. A comparison of land use/land cover change in two neighboring study areas of the Central Yucatan Peninsula, Mexico', *Forest Ecology and Management*, 256(11), pp. 1971–1983. Available at: https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.07.036.

van den Elsen, K., Quek, J.P. and Luo, D. (2021) 'Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex', *Viruses*, 13(6), p. 956. Available at: https://doi.org/10.3390/v13060956.

Estrada-Franco, J.G. *et al.* (2003) 'West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002.', *Emerging Infectious Diseases*, 9(12), pp. 1604–1607. Available at: https://doi.org/10.3201/eid0912.030564.

Estrada-Peña, A. *et al.* (2014) 'Effects of environmental change on zoonotic disease risk: An ecological primer', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, pp. 205–214. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.003.

Ezenwa, V.O. *et al.* (2006) ‘Avian diversity and West Nile virus: Testing associations between biodiversity and infectious disease risk’, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1582), pp. 109–117. Available at: https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3284.

Ezenwa, V.O. *et al.* (2007) ‘Land cover variation and West Nile virus prevalence: Patterns, processes, and implications for disease control’, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), pp. 173–180. Available at: https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0584.

Farfán-Ale, J.A. *et al.* (2004) ‘Longitudinal Studies of West Nile Virus Infection in Avians, Yucatán State, México’, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(1), pp. 3–14. Available at: https://doi.org/10.1089/153036604773082942.

Fernández-Salas, I. *et al.* (2003) ‘Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Birds, Tamaulipas State, México’, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 3(4), pp. 209–213. Available at: https://doi.org/10.1089/153036603322662192.

Ferraguti, M. *et al.* (2021) ‘A field test of the dilution effect hypothesis in four avian multi-host pathogens’, *PLoS Pathogens*, 17(6). Available at: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009637.

Figueroa-Pérez, F.M., Luna-Aragón, J.E. and Reyes-Silva, J.A. (2021) ‘Como la destrucción de la naturaleza, cambio climático y pérdida de biodiversidad aumentan el riesgo de pandemias’, *Uno Sapiens Boletín Científico De La Escuela Preparatoria No. 1*, 3(6), pp. 12–15. Available at: https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/prepa1/issue/archive.

García-Suárez, O. *et al.* (2024) ‘Seasonal mosquito (Diptera: Culicidae) dynamics and the influence of environmental variables in a land use gradient from Yucatan, Mexico’, *Acta Tropica*, 257. Available at: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107275.

González Cortés, A. *et al.* (1975) ‘ST. LOUIS ENCEPHALOMYELITIS IN HERMOSILLO, SONORA, MEXICO’’, *Pan American Journal of Public Health*, 9(4), pp. 306–316.

Grisenti, M. *et al.* (2013) ‘Lack of identification of Flaviviruses in oral and cloacal swabs from long- and short-distance migratory birds in Trentino-Alto Adige (North-eastern Italy)’, *Virology Journal*, 10(1), p. 306. Available at: https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-306.

Habarugira, G. *et al.* (2020) ‘West nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One health” implications’, *Pathogens*. MDPI AG, pp. 1–51. Available at: https://doi.org/10.3390/pathogens9070589.

Horby, P.W. *et al.* (2014) ‘Drivers of emerging zoonotic infectious diseases’, in *Confronting Emerging Zoonoses: The One Health Paradigm*. Springer Japan, pp. 13–26. Available at: https://doi.org/10.1007/978-4-431-55120-1_2.

International Committee on Taxonomy of Viruses (2023) *Genus: Orthoflavivirus*, *ICVT*. Available at: https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus (Accessed: 1 February 2024).

Joint Tripartite FAO OIE WHO and UNEP Statement (2021) *Joint Tripartite (FAO, OIE, WHO) and UNEP Statement Tripartite and UNEP support OHHLEP’s definition of “One Health”*.

Keesing, F. *et al.* (2010) ‘Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases’, *Nature*, pp. 647–652. Available at: https://doi.org/10.1038/nature09575.

Keesing, F. and Ostfeld, R S. (2021) ‘Dilution effects in disease ecology’, *Ecology Letters*, 24(11), pp. 2490–2505. Available at: https://doi.org/10.1111/ele.13875.

Keesing, F. and Ostfeld, Richard S. (2021) ‘Dilution effects in disease ecology’, *Ecology Letters*, 24(11), pp. 2490–2505. Available at: https://doi.org/10.1111/ele.13875.

Keesing, F. and Ostfeld, Richard S (2021) ‘Impacts of biodiversity and biodiversity loss on zoonotic diseases A Confusing Role for Biodiversity in Pathogen Transmission?’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(17), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2023540118/-/DCSupplemental.

Keusch, G.T. *et al.* (2022) ‘Pandemic origins and a One Health approach to preparedness and prevention: Solutions based on SARS-CoV-2 and other RNA viruses’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(42). Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2202871119.

Kindt, R. and Coe, R. (2005) ‘Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies’. World Agroforestry Centre (ICRAF). Available at: http://www.worldagroforestry.org/output/tree-diversity-analysis.

Komar, N. *et al.* (2003) ‘Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus’, *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), pp. 311–322. Available at: https://doi.org/10.3201/eid0903.020628.

Lee, L.W.F. and Mohd, M.H. (2020) ‘The Effects of Amplification and Dilution Agent in Transmitting Sin Nombre Virus (SNV) in Deer Mouse Population’, *MATEMATIKA: MJIAM*, 36(2), pp. 85–98. Available at: www.matematika.utm.my.

van Leur, S.W. *et al.* (2021) ‘Pathogenesis and virulence of flavivirus infections’, *Virulence*. Taylor and Francis Ltd., pp. 2814–2838. Available at: https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059.

Long, M.T. (2007a) ‘Flavivirus Infections’, in *Equine Infectious Diseases*. Elsevier, pp. 198–206. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2406-4.50026-0.

Long, M.T. (2007b) ‘Flavivirus infections’, in D.C. Sellon and Long Maureen T. (eds) *Equine Infectious Diseases*. Elsevier, pp. 198–206. Available at: https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/B978-1-4160-2406-4.50026-0 (Accessed: 6 September 2023).

Luna, R., Castañón, A. and Raz- Guzmán, A. (2011) ‘La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas’, *CIENCIAS*, 3 February, pp. 36–41.

Marcos, E. (2013) ‘El Concepto Una salud Como Integrador de la Interfase Humano-Animal-Ambiental, Frente a las Enfermedades Emergentes, Reemergentes y Transfronterizas’, *Epidemiología y salud*, 1(3), pp. 16–20. Available at: www.conicet.gov.ar/web/conicet.acercade.evaluacion/lista-comite_asesor_revistas_cientificas.

María, L. and Zárate, M.C. (1978) ‘ARBOVIRUS y ARBOVIROSIS EN MÉXICO’, *CIENCIA VETERINARIA*, pp. 157–182. Available at: https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol2/CVv2c6.pdf (Accessed: 24 November 2023).

Martin, L.B. *et al.* (2016) ‘Host competence: An organismal trait to integrate immunology and epidemiology’, in *Integrative and Comparative Biology*. Oxford University Press, pp. 1225–1237. Available at: https://doi.org/10.1093/icb/icw064.

Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, J.E. and Álvarez, F. (2014) ‘The study of the biodiversity in Mexico: A route with a course?’, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.). Available at: https://doi.org/10.7550/rmb.43248.

Medina-Vogel, G. (2010) ‘Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres’, *Archivos de medicina veterinaria*, 42(1). Available at: https://doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100003.

van der Meulen, K.M., Pensaert, M.B. and Nauwynck, H.J. (2005) ‘West Nile virus in the vertebrate world’, *Archives of Virology*, 150(4), pp. 637–657. Available at: https://doi.org/10.1007/s00705-004-0463-z.

Miller, E. and Huppert, A. (2013) ‘The effects of host diversity on vector-borne disease: The conditions under which diversity will amplify or dilute the disease risk’, *PLoS ONE*, 8(11). Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080279.

Murray, K.A. and Daszak, P. (2013) ‘Human ecology in pathogenic landscapes: Two hypotheses on how land use change drives viral emergence’, *Current Opinion*

in Virology. Elsevier B.V., pp. 79–83. Available at: https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.01.006.

Murray, K.O., Mertens, E. and Desprès, P. (2010) 'West Nile virus and its emergence in the United States of America', *Veterinary Research*. Available at: https://doi.org/10.1051/vetres/2010039.

Navarro-Sigüenza, A.G. *et al.* (2014) 'Biodiversidad de aves en México', *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, pp. 476–495. Available at: https://doi.org/10.7550/rmb.41882.

Ortíz-Esquivel, J.E. *et al.* (2021) 'Recent Infection of West Nile Virus in Horses from Eastern Yucatán, Mexico', *Revista MVZ Cordoba*, 26(3), pp. 1–7. Available at: https://doi.org/10.21897/rmvz.2165.

Ostfeld, R.S. (2009) 'Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens', *Clinical Microbiology and Infection*, 15(SUPPL. 1), pp. 40–43. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02691.x.

Ostfeld, R.S. and Keesing, F. (2012) 'Effects of Host Diversity on Infectious Disease', *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), pp. 157–182. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145022.

Paixão, E.S., Teixeira, M.G. and Rodrigues, L.C. (2018) 'Zika, chikungunya and dengue: The causes and threats of new and reemerging arboviral diseases', *BMJ Global Health*, 3. Available at: https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000530.

Pierson, T.C. and Diamond, M.S. (2020) 'The continued threat of emerging flaviviruses', *Nature Microbiology*, 5(6), pp. 796–812. Available at: https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0.

Plante, J.A. *et al.* (2023) 'Morphologic and Genetic Characterization of Ilheus Virus, a Potential Emergent Flavivirus in the Americas', *Viruses*, 15(1), p. 195. Available at: https://doi.org/10.3390/v15010195.

Platto, S. *et al.* (2021) 'Biodiversity loss and COVID-19 pandemic: The role of bats in the origin and the spreading of the disease', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, pp. 2–13. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.028.

Postler, T.S. *et al.* (2023) 'Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae', *Archives of Virology*, 168(9), p. 224. Available at: https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1.

Ratti, V., Winter, J.M. and Wallace, D.I. (2021) 'Dilution and amplification effects in Lyme disease: Modeling the effects of reservoir-incompetent hosts on Borrelia burgdorferi sensu stricto transmission', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(4). Available at: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101724.

Recht, J., Schuenemann, V.J. and Sánchez-Villagra, M.R. (2020) ‘Host diversity and origin of zoonoses: The ancient and the new’, *Animals*. MDPI AG, pp. 1–14. Available at: https://doi.org/10.3390/ani10091672.

Reed, K.D. *et al.* (2002) *Systematic Review Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens*, *Clinical Medicine & Research*. Available at: www.mfldclin.edu/clinmedres.

Roiz, D. *et al.* (2019) ‘Evidence that Passerine Birds Act as Amplifying Hosts for Usutu Virus Circulation’, *EcoHealth*, 16(4), pp. 734–742. Available at: https://doi.org/10.1007/s10393-019-01441-3.

Sánchez, A. *et al.* (2022) ‘In the beginning it was zoonosis: One Health to combat this and future pandemics. SESPAS Report 2022’, *Gaceta Sanitaria*. Ediciones Doyma, S.L., pp. S61–S67. Available at: https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2022.01.012.

Shen, C.-H. (2019) ‘Amplification of Nucleic Acids’, in *Diagnostic Molecular Biology*. Elsevier, pp. 215–247. Available at: https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802823-0.00009-2.

Soler-Tovar, D. *et al.* (2013) ‘Pérdida de biodiversidad: un factor determinante en el aumento de enfermedades infecciosas compartidas entre humanos y animales’, *Biodiversidad Colombia*, 1(2), pp. 52–62. Available at: https://ciencia.lasalle.edu.co/bi/vol1/iss2/6/#:~:text=La%20relaci%C3%B3n%20entre%20p%C3%A9rdida%20de%20la%20biodiversidad%20y,la%20din%C3%A1mica%20de%20tales%20enfermedades%20a%20escala%20local. (Accessed: 6 September 2023).

La Sorte, F.A. *et al.* (2016) ‘Convergence of broad-scale migration strategies in terrestrial birds’, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1823). Available at: https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2588.

Strauss, A.T. *et al.* (2015) ‘Success, failure and ambiguity of the dilution effect among competitors’, *Ecology Letters*, 18(9), pp. 916–926. Available at: https://doi.org/10.1111/ele.12468.

Swaddle, J.P. and Calos, S.E. (2008) ‘Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: Observation of the dilution effect’, *PLoS ONE*, 3(6). Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002488.

Swiss Institute of Bioinformatics (2003) *Flaviviridae*, *ViralZone*. Available at: https://viralzone.expasy.org/43?outline=all_by_species (Accessed: 29 November 2024).

Tan, M.J.A. *et al.* (2019) ‘The potential role of the ZIKV NS5 nuclear spherical-shell structures in cell type-specific host immune modulation during ZIKV infection’, *Cells*, 8(12). Available at: https://doi.org/10.3390/cells8121519.

Tavares, Y. *et al.* (2024) ‘Regional variation in the landscape ecology of West Nile virus sentinel chicken seroconversion in Florida’, *PloS one*, 19(10), p. e0305510. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305510.

Vázquez, A. *et al.* (2012) ‘Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain’, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(3), pp. 223–229. Available at: https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0687.

Vázquez-Calvo, Á. *et al.* (2017) ‘Zika virus infection confers protection against West Nile virus challenge in mice: Zika virus protects against West Nile virus’, *Emerging Microbes and Infections*, 6(1), pp. 1–6. Available at: https://doi.org/10.1038/emi.2017.68.

Villordo, S.M. *et al.* (2016) ‘RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation’, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 270–283. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002.

William Provance, D. *et al.* (2024) ‘Surpassing the natural limits of serological diagnostic tests’, *hLife* [Preprint]. Elsevier B.V. Available at: https://doi.org/10.1016/j.hlife.2024.06.001.

Yun, S.I. *et al.* (2016) ‘Complete genome sequences of three historically important, spatiotemporally distinct, and genetically divergent strains of Zika virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59’, *Genome Announcements*, 4(4). Available at: https://doi.org/10.1128/genomeA.00800-16.

Zhao, R. *et al.* (2021) ‘Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development’, *Life*, 11(7), p. 615. Available at: https://doi.org/10.3390/life11070615.

Zhao, Y. *et al.* (2015) ‘A Crystal Structure of the Dengue Virus NS5 Protein Reveals a Novel Inter-domain Interface Essential for Protein Flexibility and Virus Replication’, *PLoS Pathogens*, 11(3), pp. 1–27. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004682.

Zoladek, J. and Nisole, S. (2023) ‘Mosquito-borne flaviviruses and type I interferon: catch me if you can!’, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA. Available at: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1257024.