



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DENGUE EN MURCIÉLAGOS Y SU
POSIBLE RELACIÓN CON CICLOS SELVÁTICOS Y URBANOS EN AMBIENTES
RURALES**

T E S I S

Que presenta

Salomé Cabrera Romo

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Infectómica y Patogenesis Molecular

Directores de Tesis

Dr. Juan Ernesto Ludert León
Dr. Ángel Rodríguez Moreno

México D.F.

Mayo, 2015

COMITÉ TUTORAL.

Tutores:

Dr. Juan E. Ludert León

Departamento de Infectómica y Patogenesis Molecular,
Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN,
México.

Dr. Ángel Rodríguez Moreno

Instituto de Biología,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesores

Dra. Rosa María del Ángel.

Departamento de Infectómica y Patogenesis Molecular,
Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN,
México.

Dr. José Tapia Ramírez.

Departamento de Genética y Biología Molecular,
Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN,
México.

Dr. Humberto Lanz Mendoza

Instituto Nacional de Salud Pública,
México.

ÍNDICE

DEDICATORIA	Pág. 5
AGRADECIMIENTOS	6
FINANCIAMIENTO	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Capítulo 1. Virus Dengue	9
Generalidades del virus dengue	11
Ciclos de transmisión del DENV.	14
Capítulo 2 Murciélagos	16
Generalidades de Murciélagos.	16
Murciélagos y virus	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
Objetivos específicos	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. Captura de murciélagos	22
2. Toma de muestras biológicas	23
3. Manejo en cautiverio de murciélagos	21
4. Detección del genoma viral por RT-PCR	25
5. Ensayo de neutralización por reducción de focos	26
6. Propagación y titulación de virus	27
	3

7. Mosquitos, crecimiento y mantenimiento	27
8. Infección oral de mosquitos	28
9. Inoculación experimental	28
10. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de la proteína NS1 circulante	30
11. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) por competencia: para la detección de anticuerpos	30
RESULTADOS	32
1. Búsqueda por infección de DENV en murciélagos	32
2. Evaluación de los plasmas de murciélagos para IgG anti dengue	35
3. Inoculación experimental de murciélagos con DENV.	36
4. Evaluación de plasma y tejido para genomas virales	36
5. Evaluación de antigenemia (proteína NS1) en plasma de murciélagos inoculados	38
6. Evaluación de la presencia de anticuerpos IgG en el plasma de murciélagos inoculados.	39
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS	47
APÉNDICE	48
REFERENCIAS	52

DEDICATORIA

A mis padres: Maru y David, pues porque si, y porque los amo.

(Pero eso ya lo saben)

A mis hermanos: Ricardo y Luis Roberto.

A mi gran amigo: Surf

A todos mis amigos.

A los murciélagos.

AGRADECIMIENTOS.

A, Juan Ludert, Ángel Rodríguez Moreno, Humberto Lanz, Rosa María del Ángel, Lorena Gutiérrez, Víctor Sánchez Cordero, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de este trabajo, por todo el conocimiento que me han compartido, por su confianza, y sobre todo por la calidez que me han brindado.

A mis asesores José Tapia y Benoit de Thoisy, muchas gracias por todos sus comentarios y observaciones a lo largo del presente trabajo

A Henry Puerta, Clemente Mosso, Sofía Alcaráz, Daniel Arellano, Ana Alcalá, Humberto Olais, Rebeka Basave, Myriam Velandia, Cinthia Dionicio, Beatriz Alvarado, Juan Carlos Santos, por ayudarme a comprender un poco más de la ciencia.

A Benito Recio-Tótoro, Carlos Marx, Jonathan Tolentino, Víctor Olvera, su apoyo, compañía y ayuda en el campo fue memorable, gracias por no dejarme sola.

A los Señores Adrian Borja y Carolina Martínez, Antonio Ángel, Benito Recio, Víctor Olvera, y Jonathan Tolentino por darme refugio en el trabajo de campo.

A Cassandra González Acosta y al CERECOVE Panchimalco, por todo el apoyo que me brindaron. A todas las personas que me acompañaron al menos alguna vez en las noches de captura de murciélagos, Ruben Soto, Edgar Díaz, Jorge Peralta, Andrés Martínez, les agradezco mucho su compañía.

A Irma Miranda, Clara Castelan y a Marcela Guzman, muchas gracias el maravilloso trabajo que hacen con nosotros los estudiantes,

A mis amigos Nano, Ana Alcalá, Hector Vargas, Fernando Ruiz, Alejandro Mosso, Eduardo Mora, Juanchis, Martha, Aron Martinez, Javier Cazares, Humberto Olais, Rebeka Basave, Beatry Alvarado, Luis Chavarria, Henry Puerta y Clemente Mosso, la estancia en el CINVESTAV fue muy, muy, muy agradable y divertida con ustedes a mi lado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de posgrado otorgada.

FINANCIAMIENTOS

Parte de este proyecto fue financiado por los Proyectos CONACYT 132811, DGAPA-PAPIIT In202711 otorgado a ARM y DGAPA-PAPIIT In209314 otorgado a VSC.

Agradecemos el apoyo recibido por parte de la Secretaría Académica a cargo del Dr. Ricardo Félix Grijalva, con el cual fue posible reunir a todo el comité de asesores.

RESUMEN.

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más importante en salud pública. Existen 2 ciclos de transmisión ecológicamente distintos: el urbano o endémico que involucra al ser humano como hospedero definitivo y es transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* o por el mosquito *Aedes albopictus* como vector secundario; el otro ciclo zoonótico o selvático, involucra a primates no humanos y diversas especies de mosquitos del género *Aedes* en regiones de África y Asia; y poco se sabe de la presencia de este ciclo en regiones neotropicales. Existen diversos estudios que han reportado la presencia de RNA viral y/o anticuerpos neutralizantes en murciélagos de Ecuador, México, Costa Rica y Guyana Francesa. Dado que los murciélagos han sido identificados como reservorios potenciales de diversos virus, el objetivo de este trabajo fue evaluar la existencia de la infección por virus dengue en murciélagos capturados en regiones de centro y sureste de México y además determinar la susceptibilidad a la infección por dengue mediante inoculaciones experimentales (IE) en ejemplares de la especie *Artibeus jamaicensis*. Para cumplir el primer objetivo, se realizaron capturas de murciélagos en zonas urbanas del estado de Morelos y en zonas conservadas y perturbadas de selva en el estado de Campeche donde el Dengue es endémico. Fueron capturados 240 murciélagos de los cuáles se obtuvieron muestras de sangre y órganos (hígado y bazo) para la detección de RNA viral y búsqueda de anticuerpos contra el Dengue. En los ejemplares capturados no se observaron signos patológicos indicativos de enfermedad ni evidencia de infección por dengue, activa o pasada. Para cumplir el objetivo dos, se realizaron 4 inoculaciones experimentales (IE) utilizando 2 serotipos por diferentes vías de inoculación. Para las IE 1 y 2 los murciélagos fueron inoculados por vía subcutánea o intraperitoneal con DENV-4; para la IE-3, los murciélagos fueron inoculados vía intraperitoneal con DENV-1, a lo largo de estos ensayos se utilizaron murciélagos inoculados Mock como control negativo; finalmente en la IE 4, los murciélagos fueron inoculados por picadura de mosquitos *Aedes aegypti* infectados con DENV-1 o DENV-4. Las muestras de

sangre y bazo colectadas a partir del día 1 y hasta el día 17 para la detección de RNA viral y búsqueda de anticuerpos contra el dengue no mostraron la presencia de RNA en ninguna de las muestras y tampoco se observó la presencia de antigenemia ni de anticuerpos específicos anti-DENV IgG. Estos resultados sugieren que los murciélagos *Artibeus jamaicensis* no son capaces de mantener una infección de DENV o de actuar como reservorios para el virus.

INTRODUCCIÓN.

Capítulo 1. Virus Dengue.

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más importante que afecta a los humanos. Ésta enfermedad es endémica en más de 100 países en zonas tropicales y subtropicales, donde se estima que más de 100 millones de casos son reportados anualmente asociados con más de 25,000 casos de mortalidad, principalmente en niños menores de 5 años. Por tal motivo la enfermedad de dengue se ha convertido en un problema de salud pública. (Guzman et al., 2010)

El virus dengue (DENV) tiene una relación cercana con los humanos de más de 1700 años, sin embargo en años recientes la interacción de éste patógeno con los humanos se ha incrementado debido a la expansión de mercados internacionales, migración o movimiento de las poblaciones humanas, cambios en los ecosistemas y un deficiente control del vector (Vasilakis et al., 2011).

Recientemente se ha observado una re-emergencia dramática en el número de casos de DENV en Latinoamérica y un alarmante incremento de casos de fiebre por dengue y dengue hemorrágico (Ramirez et al., 2010). Esta emergencia y expansión son el resultado del incremento en las poblaciones humanas y en la densidad de población del mosquito vector *Aedes aegypti* (Gaunt et al., 2001). Actualmente todos los serotipos de dengue se han expandido globalmente, provocando epidemias de intensidad y patogenicidad variable (Weaver y Vasilakis, 2009). México es un país endémico para el dengue donde circulan los 4 serotipos (Dantés et al., 2014).

El contagio con cualquiera de los 4 serotipos del DENV puede resultar en una infección moderada o subclínica generando la enfermedad conocida como fiebre por dengue; sin embargo, una pequeña proporción de los pacientes pueden desarrollar casos de dengue severo causando una fiebre hemorrágica

por dengue. En el primer caso, el dengue se caracteriza por fiebre elevada, dolor de cabeza, dolor muscular y articular, prurito, dolor retro-orbital, y ocasionalmente alteraciones gastrointestinales; mientras que en los casos severos de dengue, los pacientes presentan cuadros de hemorragia, fuga plasmática y dificultad respiratoria (Martina et al., 2009, Simmons et al., 2012).

En años recientes, la prevalencia de los 4 serotipos del DENV ha incrementado, y con ello la diversidad genética del virus. La evolución del DENV ha tenido un gran impacto en la virulencia y epidemiología de la enfermedad (Klungthong et al., 2008). A pesar de los importantes brotes de dengue en las poblaciones humanas, en la actualidad no existen vacunas ni tratamientos específicos para esta enfermedad (Whitehorn y Simmons, 2011). Aunado a esto, no existen modelos animales para la infección del DENV que permitan reproducir la dinámica del virus en el hospedero (Zompi y Harris, 2012).

Generalidades del virus dengue.

El virus Dengue (DENV), pertenece a la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus*; el cuál, además agrupa diversos patógenos importantes para la salud pública, que pueden cursar con cuadros de encefalitis y fiebre hemorrágica. El DENV presenta 4 serotipos, antigénicamente distintos pero génicamente relacionados (DENV-1 al DENV-4). Posee un genoma de cadena sencilla con polaridad positiva de aproximadamente 11 kb con un solo marco de lectura abierta (ORF), flanqueada por regiones no traducida (UTR's) 5' y 3' (Gebhard et al., 2011).

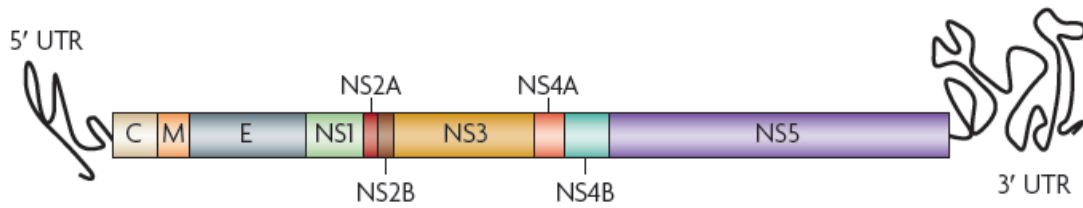


Figura 1. Representación esquemática del genoma del virus dengue, flanqueado por regiones no traducidas (UTR's). El marco de lectura abierta codifica las proteínas estructurales de la cápside (C), membrana (M) y de envoltura (E) y también las proteínas no estructurales; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B Y NS5. Fuente: Guzman et al., (2010)

La entrada del virus a la célula del huésped se inicia con el acercamiento del DENV a la superficie de la célula; luego, la proteína E interactúa con los receptores virales que median la unión y la posterior endocitosis del virus, una vez internalizado y posterior a la acidificación del endosoma se lleva a cabo la fusión de la membrana del virus con las vesículas; este proceso permite la liberación del RNA genómico en el citoplasma, el cual funciona como RNA mensajero. La traducción del único marco de lectura en el retículo endoplásmico produce una poli proteína la cual es fragmentada por proteasas celulares y la actividad de la proteína NS3, que libera de forma ordenada las 3 proteínas estructurales (C, prM/M y E) las cuales son componentes de la partícula del virión maduro, y las 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral (Back y Lundkvist, 2013). Ambos tipos de proteínas se describen en la Tabla 1.

Después de la traducción del RNA, ocurre una hipertrofia en las membranas intracelulares inducida por el virus, originando estructuras conocidas como complejos membranales y vesículas de envoltura. La síntesis del RNA viral sucede en estrecha asociación con la membrana celular dentro de las vesículas de envoltura llamadas complejos replicativos. La síntesis de cadenas negativas de RNA sirven como templado para la amplificación de cadenas positivas de RNA genómico (Back y Lundkvist, 2013).

Tabla 1. Características y función de las proteínas estructurales y no estructurales del virus dengue.

PROTEÍNAS	CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN
Estructurales	
Cápside (C)	Es un homodímero de 11kDa, que es necesaria para la encapsidación del genoma RNA.-
Membrana (M)	Es expresada como una glicoproteína precursora (prM) de 27 – 31 kDa, la cual unida a la proteína E forma un complejo heterodímero, donde prM es necesaria para el arreglo de la proteína E.
Envoltura (E)	Con un peso de 53kDa aproximadamente, es la proteína más expuesta de la superficie del virus. Esta proteína está involucrada en la unión e internamiento del virus en la célula, así como en la determinación del serotipo viral y la inducción de la respuesta inmune.
No estructurales	
NS1	Es una proteína de 46kDA anclada en sitios intra celular y en la membrana plasmática, esta proteína es secretada al medio extra celular y circula en el suero de pacientes en las etapas tempranas de la infección, por lo que la detección de la proteína NS1 es la base de diversos ensayos comerciales de diagnóstico.
NS2A	Es una proteína de 22kDA, involucrada en la coordinación de cambios entre el empaquetamiento de RNA y la replicación, además de actuar como un posible antagonista del interferón. Análisis recientes indican que el gen que codifica para la proteína NS2A se encuentra bajo una débil presión de selección, un proceso que tiene una importante influencia en la evolución del virus durante el proceso de transmisión
NS2B	Es una proteína asociada a membrana de 14kDa la cual está asociada a la proteína NS3 para formar un complejo de proteasas virales, el cual tiene la función de cofactor en la activación de la DENV serin-proteasa del NS3
NS3	Es una proteína multifuncional de 70kDa con funciones de actividad enzimática tipo tripsina serin-proteasa, helicasa, RNA trifosfatasa (RTPasa), está involucrada en los procesos de poli proteínas virales y en la replicación del RNA.
NS4a y NS4b	Son pequeñas proteínas hidrofóbicas de 16 y 27kDa respectivamente, actuando como inhibidores en la señalización del interferón (IFN).
NS5	Es la proteína más conservada entre todos los flavivirus de 103kDa. Esta proteína posee actividad enzimática, ya que actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción viral

El proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del RNA genómico y la proteína C, posteriormente se asocian las proteínas prM/M y E, que deben estar inmersas en la membrana del retículo endoplásmico. Finalmente suceden dos etapas de maduración de la partícula viral. Primero se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM/M y E, en donde la primera recubre a la segunda. En el segundo paso, esta partícula inmadura transita desde el retículo endoplásmico hasta las regiones cis y trans del aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración. En esta última etapa, los cambios de conformación y de rotación de la proteína E generan homotrímeros antiparalelos de la misma. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM/M por la proteasa furina, independiza el péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de E y mantiene unido al péptido pr generando así el virión maduro e infeccioso. (Velandia y Castellanos, 2011)

Ciclos de transmisión del DENV.

El DENV es mantenido en la naturaleza a través de 2 ciclos ecológica y evolutivamente distintos; el ciclo endémico o humano y el ciclo selvático o enzótico (Weaver y Vasilakis, 2009). En el ciclo urbano, el mosquito *Aedes aegypti* es el vector principal, y los humanos actúan como reservorios u hospederos amplificadores. En el ciclo selvático, mosquitos del género *Aedes* mantienen el ciclo de transmisión entre poblaciones de primates no humanos, quienes actúan como reservorios u hospederos amplificadores; sin embargo este ciclo sólo ha sido documentado en Asia y en África. (Vasilakis et al., 2011).

Las poblaciones humanas constantemente han estado expuestas a cepas selváticas de DENV, se cree que un proceso de adaptación mediante la transmisión cruzada entre especies ocurrió en una zona de emergencia (figura 2); y el ciclo endémico/epidémico evolucionó después de que las poblaciones humanas incrementaran lo suficiente para actuar como reservorios del virus (Wang et al., 2000).

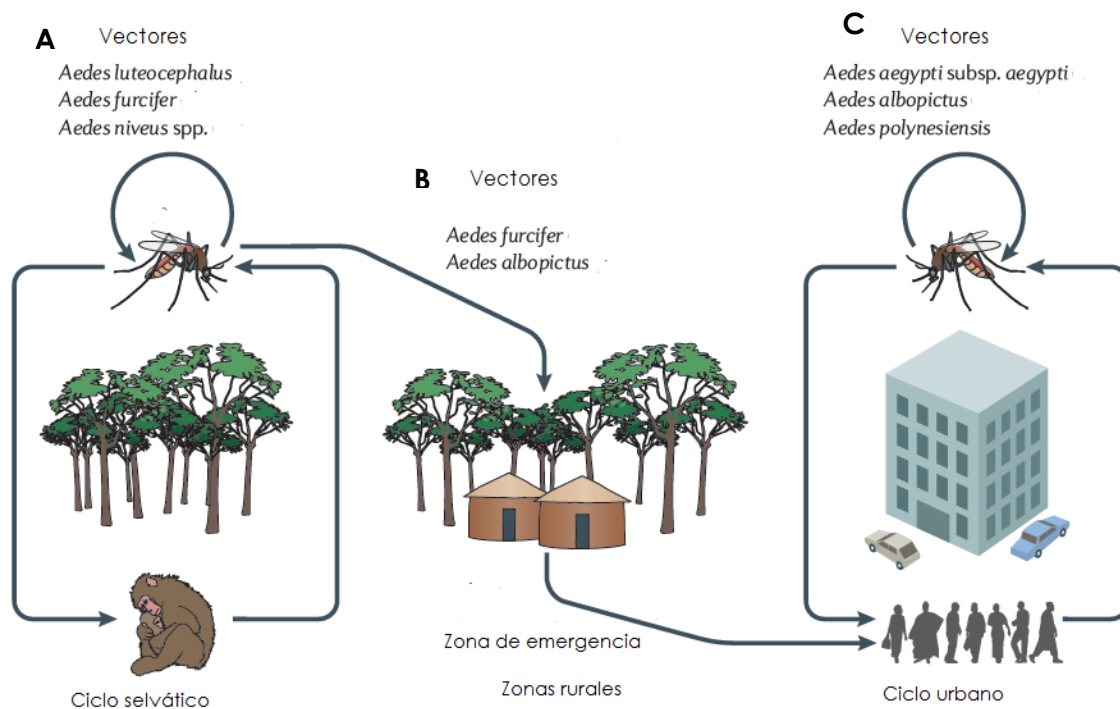


Figura 2. Ciclos de transmisión del virus Dengue. (A) Ciclo selvático, involucra a los primates no humanos del viejo mundo como hospederos y mosquitos del género *Aedes* como vectores. (B) Zona de emergencia en la cual las cepas selváticas entraron en contacto con las poblaciones humanas. (C) Ciclo urbano, involucra al humano como hospedero y al mosquito *Aedes aegypti* como vector principal. Fuente: Vasilakis et al., (2011)

Estudios filogenéticos sugieren que los 4 serotipos de DENV (aunque sólo han sido aisladas cepas selváticas de los serotipos el DENV-1, DENV-2 y DENV-4), evolucionaron independientemente de linajes selváticos, probablemente a partir de mosquitos habitantes de dosel, donde inicialmente se estableció la adaptación en primates no humanos en ambientes selváticos en Asia y África. (Vasilakis et al., 2011, Wang et al., 2000). Sin embargo, recientemente diversos autores han reportado evidencia que sugiere que el ciclo selvático de DENV entre diferentes especies de pequeños mamíferos silvestres puede estar presente, o circular en América (de Thoisy et al., 2009)

El establecimiento de cepas selváticas en poblaciones humanas podría generar importantes brotes epidémicos con repercusiones en la salud pública, (Vasilakis et al., 2008). Existen reportes de casos de fiebre hemorrágica por dengue y de fiebre por dengue, en pacientes originarios de África; los cuáles fueron infectados por cepas selváticas;(Franco et al., 2011, Vasilakis et al., 2011). Dado que las infecciones con cepas selváticas de DENV pueden manifestarse con síntomas clínicos indistinguibles de los síntomas que se presentan en infecciones en ciclos urbanos por cepas urbanas, la detección de cepas selváticas en infecciones de DENV en humanos puede verse limitada debido al diagnóstico erróneo o por la confusión con otros agentes etiológicos que producen síntomas y signos clínicos similares (Coffey et al., 2013b, Franco et al., 2011).

Capítulo 2. Murciélagos.

Generalidades de Murciélagos.

Los murciélagos son ampliamente diversos en tamaños y formas, con características anatómicas y estilos de vida distintos; pertenecen al orden *Chiroptera*, el segundo orden más abundante entre los mamíferos, representado por 20 familias y 1300 especies reconocidas (Ceballos y Oliva, 2005, Fenton y Simmons, 2015). Los murciélagos se encuentran ampliamente distribuidos en todos los continentes, excepto en la Antártida y debido a que tienen la habilidad de volar, han logrado colonizar muchas islas oceánicas. (Fenton y Simmons, 2015, Neuweiler, 2000). La riqueza de especies incrementa hacia los trópicos, más de 350 especies de murciélagos habitan en América y el Caribe (Altringham, 2011, Medellín et al., 2000).

Estos mamíferos son de hábitos nocturnos, y aquellos que habitan en zonas tropicales están activos todo el tiempo, comparado con los que habitan en zonas templadas que en algunos casos pueden migrar o hibernar debido a las condiciones climáticas y ambientales poco favorables (Neuweiler, 2000). El promedio de vida varía entre especies, sin embargo se ha reportado que algunas

especies pequeñas de murciélagos pueden vivir hasta 30 años (Moratelli y Calisher, 2015). La dieta de estos mamíferos es muy variada ya que pueden ser de hábitos alimenticios frugívoros, insectívoros, nectarívoros, hematófagos, polinívoros, piscívoros o carnívoros (Ceballos y Oliva, 2005, Fenton y Simmons, 2015).

Los murciélagos son de hábitos sociales gregarios y de acicalamiento mutuo, algunas especies de murciélagos están en contacto constante con poblaciones humanas, ya que llegan a utilizar estructuras artificiales o plantaciones frutales como sitios de descanso donde pueden establecer colonias muy grandes aunque también es común hallar individuos solos (Ceballos y Oliva, 2005, Medellín et al., 2000).

La invasión del hábitat natural de los murciélagos por parte de los humanos ha sido un evento creciente, lo que ha favorecido el incremento en las tasas de contacto entre ambas poblaciones, pero también con vectores (Moratelli y Calisher, 2015, Dobson, 2005, Hayman et al., 2013), ello puede iniciar una transmisión de patógenos entre especies en grupos localizados de personas, o de otras especies tipo "Spillover"; es decir sin llegar a ser una transmisión sostenida. Se define "Spillover" como la transmisión de virus entre especies diferentes en grupos pequeños localizados de personas o de otros animales, sin una transmisión sostenida (Vasilakis et al., 2011).

Aun cuando evolutivamente, los murciélagos se separaron del resto de los mamíferos hace más de 50 millones de años (Fenton y Simmons, 2015), comparten rasgos inmunológicos con los humanos, como por ejemplo la activación del sistema inmune innato a través de la producción de interferón (IFN) ante infecciones virales o bien características de inmunidad adaptativa como la presencia de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM (identificadas en suero de murciélagos *Artibeus jamaicensis*) que han sido descritas como análogas a las de los humanos (McMurray et al., 1982).

Si bien el vuelo, que es la característica que distingue a estos mamíferos de los demás, pudo haber tenido efectos en algunos aspectos de la evolución del

sistema inmune y en su metabolismo (Brook y Dobson, 2015), la diversidad de los murciélagos y sus características biológicas y ecológicas los ha colocado como reservorios y hospederos de diferentes agentes infecciosos, así más de 200 virus de 27 familias han sido aislados o detectados en algunas especies de murciélagos (Moratelli y Calisher, 2015), aunque menos del 2% de los agentes patógenos que afectan a los humanos utiliza a los murciélagos como reservorios (Dobson, 2005).

Murciélagos y virus

La asociación entre murciélagos y enfermedades en humanos se conoce hace más de un siglo, desde la primera vez que se identificó el virus de la rabia *Lyssavirus* en un murciélago hematófago (vampiro) (Brook y Dobson, 2015). Sin embargo, recientemente este orden de mamíferos ha sido estudiado por su papel como reservorios potenciales de una amplia variedad de infecciones zoonóticas que involucran virus RNA. El número de virus identificados en murciélagos ha incrementado rápidamente después del descubrimiento del virus Nipah y el virus de síndrome respiratorio agudo severo (SARS-Co); actualmente más de 80 virus incluyendo miembros de la familia *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Arenaviridae*, *Herpesviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae* y *Adenoviridae*, han sido aislados de diferentes especies de murciélagos. (Calisher et al., 2006).

Además de los virus encontrados en murciélagos que provocan enfermedad con cuadros severos en humanos, existen otros virus que no muestran evidencia de enfermedad en animales o humanos. Estos virus han sido descubiertos en murciélagos en aparente buen estado de salud (Shi, 2010) y algunos de ellos pertenecen a la familia *Flaviviridae* como por ejemplo el virus Rio Bravo, el virus Tamama (TABV) y Entebbe bat virus (ENTV) los cuales se consideran flavivirus exclusivos de murciélagos, aunque sus vectores no sean conocido (Thompson et al., 2015, Kuno, 2001, Gaunt et al., 2001).

Recientemente se han llevado a cabo estudios donde buscan la presencia de *Flavivirus* como el DENV en murciélagos. En un estudio realizado en Costa Rica y Ecuador, Platt et al (2000), reportaron la presencia de anticuerpos neutralizante

contra DENV en un 30% de los murciélagos muestreados en Ecuador (n=10), en un 20 % de los murciélagos muestreados en zonas peri-urbanas en Costa Rica (n=49) y en un 22.6% (n=53) en murciélagos pertenecientes a los géneros *Uroderma*, *Artibeus*, *Molossus* y *Carollia*, muestreados en la zonas urbanas de Costa Rica. Por otro lado, de Thoisy et al., (2009) tomaron muestras de 27 especies silvestres de pequeños mamíferos en la Guyana Francesa, y encontraron evidencia de la presencia de RNA de DENV en diversas especies de mamíferos, entre ellas murciélagos de las especies *Artibeus planirostris* y *Carollia perspicillata*.

En México, Marchain-Williams et al., (2013) tomaron muestras de suero de 140 murciélagos de especies diferentes, capturados en zonas urbanas y periurbanas en la península de Yucatán donde el DENV es endémico. En dicho estudio se realizó el ensayo de neutralización por reducción de focos en suero de murciélagos capturados en zonas urbanas. Los sueros fueron probados en una dilución de 1:20 y aquellos con un reducción del número de focos $\geq 90\%$ (PRNT₉₀) fueron considerados positivos a la prueba; en su estudio el 19 % de los murciélagos mostraron evidencia de infección por flavivirus, con títulos neutralizantes contra los 4 serotipos de DENV. Las especies que presentaron anticuerpos en esta prueba fueron *Artibeus jamaicensis*, *Artibeus lituratus*, y *Glossophaga soricina*.

También en México, Aguilar-Setien et al., (2009) reportaron la presencia de NS1 circulante (antigemia) y RNA de DENV en murciélagos capturados en los estados de Morelos, Colima y Veracruz; las especies reportadas con estos hallazgos son *Natalus stramineus*, *Artibeus jamaicensis*, *Carollia brevicauda*, *Myotis nigricans* y *Sturnira lilium* Finalmente Sotomayor-Bonilla et al., (2014) también reportan la presencia de RNA DENV en murciélagos de las especies *A. jamaicensis*, *A. lituratus*, y *G. soricina*, capturados en los estados de Campeche y Chiapas.

La evidencia anteriormente mencionada, sugiere que mamíferos silvestres, específicamente los murciélagos, pueden ser portadores del DENV, y posiblemente mantener la infección en la naturaleza. Sin embargo, el papel que de estas especies de mamíferos en el ciclo de transmisión del virus en áreas rurales y selváticas es incierta. Además, poco se sabe del proceso de transmisión del DENV en las especies de murciélago reportadas; es decir, se desconoce si el

origen se llevó a cabo como consecuencia de una adaptación del DENV proveniente de cepas humanas ("Spillover") generado por la transmisión de virus entre pequeños grupos de diferentes especies (Vasilakis et al., 2011) o bien debido a la existencia de un verdadero ciclo selvático con la circulación de cepas selváticas en zonas tropicales.

Debido a que la evidencia reportada anteriormente indica que los murciélagos pueden ser reservorios del DENV, pero no es conclusiva y dada las necesidades de realizar estudios ecológicos y epidemiológicos para evaluar el papel de nuevos hospederos vertebrados en el mantenimiento del ciclo selvático del DENV (Conway y Roper, 2000, Parrish et al., 2008), se realizó el presente trabajo bajo la siguiente justificación:

JUSTIFICACIÓN

Considerando que algunos *Flavivirus* de origen africano, como la fiebre amarilla, han establecido ciclos selváticos en América y que existe evidencia que sugiere la existencia de ciclos selváticos de DENV en América, se hace necesario profundizar en el estudio del ciclo selvático del DENV para así entender mejor la biología de este patógeno, y para poder evaluar medidas de control de la enfermedad, ya que el ciclo selvático puede actuar como fuente de reintroducción de cepas selváticas en poblaciones humanas o bien establecerse en nuevos hospederos.

HIPOTESIS

La infección por el virus del Dengue en murciélagos se limita a una transmisión del virus que afecta sólo a grupos pequeños y localizados de animales y es de origen humano (spillover), sin que exista una verdadera transmisión sostenida (ciclo selvático) entre murciélagos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la existencia de infección por virus dengue en murciélagos de distintas especies capturadas en la región central y del sureste de México. Además evaluar experimentalmente la susceptibilidad de los murciélagos a la infección por dengue mediante inoculaciones experimentales.

Objetivos específicos

1. Buscar evidencia de infección por el virus dengue dengue en murciélagos de diversas especies capturados en ambientes selváticos y en zonas urbanas y peri-urbanas con casos de dengue reportados.
2. Determinar si los murciélagos tienen el potencial de replicar el virus del dengue mediante infecciones experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Captura de murciélagos.

Las capturas de murciélagos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Americana de Mastozoólogos para el uso de mamíferos silvestres (Sikes y Gannon, 2011) y bajo el permiso de colecta SGPA/DGVS/00471/11 otorgado por la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente. Para llevar a cabo el objetivo 1, se hicieron colectas en 8 sitios en el estado de Morelos y en 7 sitios del estado de Campeche. Cada sitio fue muestreado durante 2 noches seguidas; las características de cada uno de los sitios de muestreo se describen en la Tabla 2. Además en la Tabla se reportan los números de casos reportados de dengue ocurridos en las zonas de muestreo. Los murciélagos fueron capturados en redes de niebla, las cuales fueron colocadas antes de la puesta de sol y permanecieron abiertas durante 4 horas. Una vez capturados y liberados de las redes, los murciélagos fueron colocados individualmente en sacos de tela para transportarlos al laboratorio o sitio de trabajo, donde se llevó a cabo la identificación de cada individuo siguiendo la guía de campo de Medellín et al., (2008). Hembras lactantes y gestantes fueron liberadas inmediatamente. Adicionalmente y para llevar a cabo el objetivo 2 de

este trabajo, se realizó la captura de murciélagos de la especie *Artibeus jamaicensis* en el estado de Morelos y los ejemplares capturados fueron colocados en sacos para transportarlos a los encierros ubicados en el bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), en Cuernavaca Morelos. Ningún murciélago murió ni sufrió lesiones durante el procedimiento de manejo.

2. Toma de muestras biológicas.

Los murciélagos fueron anestesiados con Pentobarbital sódico (0,2mL/mL volumen total vía intra peritoneal) y eutanasiados por exanguinación mediante punción cardíaca utilizando jeringas con 100 µL de heparina por cada 1 mL de sangre. La sangre fue centrifugada a 1300 x g durante 5 minutos para la obtención de plasma. Después de obtener las muestras de sangre, se realizó la necropsia a todos los animales, se extirparon todos los órganos y junto con el plasma, fueron congelados en nitrógeno líquido para transportarlos al laboratorio, donde permanecieron congelados a -70°C hasta el momento de ser procesados.

Para el objetivo 2, los murciélagos fueron marcados individualmente utilizando barniz de uñas con la finalidad de asignar un número clave para su identificación, para los murciélagos inoculados con DENV se asignaron números y para los murciélagos utilizados como controles negativos se asignaron letras. (Apéndice 1). Antes de iniciar cualquiera de las inoculaciones experimentales, los murciélagos fueron sangrados por punción de la vena cefálica utilizando agujas 21G Becton Dickinson (BD), 3 o 4 días después de la captura y un día antes de la inoculación experimental. Aproximadamente 80µL de sangre fueron recolectadas con tubos capilares heparinizados y almacenados a -70°C hasta la extracción de RNA y detección del genoma del DENV por RT-PCR. La toma de muestras de plasma y órganos, se realizó tal como se describe en el párrafo anterior (Apéndice 1).

Tabla 2. Datos, localización, características de los sitios de muestreo y número de casos de dengue reportados durante las mismas fechas y sitios de captura

Estado	Murciélagos capturados	Características del hábitat	Casos de dengue confirmados en los sitios de captura			Referencia geográfica
			2011	2012		
Morelos			Sep- Oct.	May- Jun.	Sep- Oct.	
Amacuzac	36	Peri-urbana	6	6	-	18°35'48.83"N 99°22'21.55"O
Bonanza	11	Peri-urbana	-	15	-	18°36'12.98"N 99°12'28.22"O
Higuerón	1	Peri-urbana	-	-	-	18°33'37.33"N 99°10'38.49"O
Jojutla	36	Urbana	-	15	78	18°36'15.48"N 99°10'44.72"O
San Gabriel	30	Urbana	4	-	-	18°39'37.64"N 99°12'5.22"O
Tlaquiltenango	4	Peri-urbana	-	-	-	18°37'59.39"N 99° 8'52.99"O
Xoxocotla	16	Peri-urbana	-	-	-	18°41'21.39"N 99°13'52.23"O
Zacatepec	15	Urbana	-	45	27	18°39'37.64"N 99°12'5.22"O
Campeche						
Samulá	9	Urbana	-	-	764*	19°49'8.53"N 90°33'9.99"O
Lerma	7	Peri-urbana	-	-	-	19°46'58.31"N 90°36'23.33"O
Hampolol	12	Selva mediana caducifolia.	-	-	-	19°56'33.62"N 90°22'28.90"O
Chencolli	38	Selva baja caducifolia con parcelas	-	-	-	19°48'12.99"N 90°15'33.47"O
Sabancuy	4	Peri-urbana	-	-	-	18°58'41.90"N 91° 9'36.78"O
Chikbul	14	Peri-urbana	-	-	-	18°46'51.39"N 90°56'18.12"O
Manantiales	7	Selva mediana caducifolia.	-	-	-	18°42'58.06"N 91° 4'43.24"O

*Número de casos reportados de dengue en la ciudad de Campeche, no hay registros disponibles en los sitios de muestreo, debido a lo remoto de las localidades.

3. Manejo en cautiverio de murciélagos.

Para llevar a cabo las inoculaciones experimentales, se construyeron 3 encierros utilizando tubos de PVC de 1.5 pulgadas de diámetro y con conectores de PVC, con los cuales se armaron estructuras cúbicas de 1 m³, cubierto con malla sombra y atado en la base de cada tubo (Apéndice 2). Cada encierro tenía 2 aberturas en la parte superior, por las cuales se introducía el alimento. Se colocaron 10 murciélagos por encierro y se mantuvieron en observación y cuarentena por una semana. Diariamente fueron alimentados con fruta y agua fresca *ad libitum*.

4. Detección del genoma viral de DENV por RT-PCR.

El RNA total fue extraído de bazo o hígado con TRIzol Reagen (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. El RNA fue transcrito en cDNA por 50 minutos a 42°C usando cebadores hexámeros de secuencia aleatoria (New England, Biolabs) y la enzima SuperScript II transcriptasa reversa (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Dos micro litros de cDNA fueron utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esta reacción se utilizó Taq DNA polimerasa (Kapa Biosystems) y cebadores D1 sentido y D2 antisentido, como los reporta Lanciotti et al., (1992). Como controles para cada reacción se utilizó agua, en lugar de ácidos nucleicos como control negativo, y ácidos nucleicos extraídos de cerebro de ratón neonato inoculado con DENV-1 o DENV-4 como controles positivos. Como un control positivo adicional de extracción de RNA, el cDNA generado fue también amplificado en paralelo en la reacción de PCR utilizando los cebadores específicos para el gen GAPDH (sentido 5'-GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG-3' y antisentido 5'-TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG-3'). Ambas amplificaciones fueron realizadas de la siguiente manera: incubación inicial a 94°C durante 10 minutos, posteriormente 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, y finalmente una incubación de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados en geles de electroforesis al 1.5% de agarosa y visualizados con bromuro de etidio. Adicionalmente, para controlar la presencia de inhibidores en la reacción de RT-PCR, se homogenizaron 300mg de tejido (bazo e hígado) con 50 µl de DENV-4

(1×10^7 UFP/ml) propagado en cerebro de ratón, para realizar posteriormente la extracción de RNA y retrotranscripción. El cDNA fue diluido 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 en agua *Milli-Q*. De estas diluciones se utilizaron dos microlitros para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5. Ensayo de neutralización por reducción de focos.

Para este ensayo se utilizaron platos de 96 pozos donde se colocaron 60 μ l de una dilución viral 1:500 en medio de mantenimiento (MEM Gibco®) (conteniendo entre 100 y 200 focos) mezclada con 3 μ l de plasma de murciélago, para obtener una dilución final del plasma de 1:20; el ensayo se realizó con el serotipo DENV-4 cepa H241. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo de incubación, en una placa de 96 pozos con monacapa confluyente de células epiteliales de riñón de mono verde (Vero), las cuales fueron crecidas y mantenidas en medio mínimo esencial (MEM Gibco®) suplementado con un 7.5% de suero fetal bovino (SFB) y mantenidas a 37°C con 5% de CO₂, se agregaron 60 μ l por pozo de la mezcla virus-plasma para inocular las células. Posterior a esto las células fueron incubadas durante 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el medio MEM, y se agregaron 60 μ l de medio de mantenimiento por pozo, para mantener las células por 24 horas en incubación a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células fueron fijadas con metanol frío (-20°C), durante 20 minutos. El plato fue lavado con buffer fosfato salino (PBS) 2 veces, para agregar anticuerpo primario monoclonal de ratón 2H2 anti DENV diluido 1:4, e incubado 1 hora a 37°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se repitieron los lavados con PBS para agregar el anticuerpo secundario monoclonal anti ratón conjugado a peroxidasa (Laboratorios GenTex), diluido 1:300, e incubar nuevamente por 1 hora a 37°C. Finalmente tras repetir nuevamente los lavados, se agregó como sustrato diamino bencindina (Metal Enhanced DAB Substrate Kit, Pierce-Thermo Scientific) y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Se consideró como positivo aquel plasma de murciélago diluido 1:20 que fuera capaz de reducir el número de focos en un 50% o más. Como controles de competencia, se utilizó un suero humano negativo

para IgG anti DENV (diluido 1:20), como control positivo se utilizó un suero de humano IgG positivo contra DENV (en diluciones 2x desde 1:20 hasta 1:640), ambos sueros previamente evaluados con la prueba comercial de Panbio (Dengue IgG capture ELISA). Como control adicional, se utilizó un anticuerpo monoclonal neutralizante que reconoce la proteína E de los 4 serotipos de dengue (4G2; en diluciones 2X desde 1:20 hasta 1:1600).

6. Propagación y titulación de virus.

El DENV-1 cepa Hawái (donada amablemente por el Dr. Juan Salas del IPN) y el DENV-4 cepa H241, fueron propagadas en células C6/36 HT. La monocapa fue crecida en frascos 75 mm² los cuales fueron inoculados con DENV con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 durante 1 hora. Posterior a la inoculación, las células fueron mantenidas en medio mínimo esencial (MEM Gibco®), suplementado con 7% de SFB y mantenido a 34°C durante una semana. Las células fueron congeladas y descongeladas 2 veces, el sobrenadante fue colectado y separado en alícuotas (0.6mL) y congelado a -70°C hasta su uso. El título del DENV fue determinado por ensayo de placas inoculando las células con soluciones seriadas en mono capas confluentes de células BHK crecidas en platos de 24 pozos, siguiendo los protocolos descritos por Ludert et al., (2008).

7. Mosquitos, crecimiento y mantenimiento.

Los mosquitos *Aedes aegypti* de la cepa Rockefeller utilizados en las inoculaciones experimentales, se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (26-28°C) y de humedad (70-80%) en fotoperiodos de luz-obscuridad con ciclos de 12H/12H, en el insectario del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca Morelos. Los huevos de mosquito fueron eclosionados y criados en contenedores de agua a una densidad de 200 a 300 larvas por litro de agua, alimentados diariamente con alimento de alta calidad según lo descrito por Moreno-Garcia et al., (2010). Las pupas se colocaron dentro contenedores hasta la emergencia de la fase adulta, las cuáles fueron mantenidas con solución de sucrosa al 10% *ad libitum*.

8. Infección oral de mosquitos.

Hembras adultas *Aedes aegypti*, de 4-6 días de edad, fueron privados de alimento por 4 horas, posteriormente fueron alimentados con sangre infectada, la cual fue colocada en alimentadores para mosquitos y cubiertas por piezas de Parafilm M (Ulti Dent) y sujetadas a los alimentadores. La sangre infectada consistió en 500µL de sangre fresca de conejo heparinizada y mezclada con un volumen igual de inóculo viral. La mezcla de alimento fue mantenida a 37°C mediante la circulación de agua caliente a través de los alimentadores. Los mosquitos del grupo "a" fueron alimentados con DENV-4 (4.2×10^4 UFP/mL), y los del grupo "b" fueron alimentados con DENV-1 (1.2×10^4 UFP/mL). Se ha demostrado que dosis en estos rangos, pueden ser infectivas para hembras *A. aegypti* (Lambrechts et al., 2012), desde tres días después de la alimentación con sangre infectada, y hasta el día 12 (Salazar et al., 2007). Cinco hembras mosquito de cada grupo fueron diseccionadas diariamente, el abdomen y torax de cada grupo fueron macerados por separado en 100 µL de TRIzol REagent (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA extraído fue inmediatamente probado por RT-PCR en búsqueda de RNA DENV. En concordancia con resultados previamente reportados por Salazar et al., (2007), el máximo rango de infección fue observado a partir del día 5 en abdomen y del día 8 en tórax.

9. Inoculación experimental.

Se utilizaron 52 murciélagos de la especie *Artibeus jamaicensis* para realizar 4 protocolos de inoculación experimental. Para la primera inoculación experimental (IE-1), se inocularon 10 murciélagos vía subcutánea en la zona de los pectorales con 200µL de DENV-4. Para la segunda inoculación experimental (IE-2) se cambió la vía de inoculación y 8 murciélagos fueron inoculados intraperitonealmente con 200µL de DENV-4. Para la (IE-3) se trabajó con el serotipo 1 de DENV y 10 murciélagos fueron inoculados intraperitonealmente con 200µL del virus. En este ensayo, inmediatamente después de la eutanasia de los murciélagos se

recolectaron alícuotas de 0.5mL de sangre completa estas alícuotas fueron usadas inmediatamente para alimentar un grupo de 10 mosquitos por murciélago. Los mosquitos fueron mantenidos en el insectarios del INSP en condiciones controladas anteriormente descritas y 7 días post-alimentación, cada grupo de mosquitos fue macerado en buffer salino fosfato, y centrifugado a baja velocidad; el sobrenadante clarificado fue probado para la presencia de la proteína NS1 con el kit comercial Platelia Dengue NS1 Ag (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante. (Voge et al., 2013). El título de cada inóculo fue de 2.4×10^4 unidades formadoras de placas (UFP/mL) y de 8.4×10^4 UPF/mL para DENV-1 y para DENV-4, respectivamente. La viabilidad de los inóculos virales fue probada en paralelo inoculando cerebro de ratones neonatos, los cuales mostraron signos nerviosos a los 5-7 días post-inóculo. Además los cerebros de dichos ratones fueron colectados para comprobar la presencia de RNA viral por RT-PCR. Para cada IE, fueron inoculados 5 murciélagos como controles negativos bajo las mismas condiciones experimentales pero con sobrenadante de células C6/36 HT no infectadas (Inoculados Mock) y estos murciélagos fueron mantenidos en encierros separados. Finalmente para la IE-4, los murciélagos se inocularon directamente con mosquitos *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller, infectados con virus dengue siguiendo el procedimiento antes descrito. Se utilizaron 5 murciélagos para ser inoculados por el grupo de mosquitos "a" y 5 murciélagos para el grupo "b". Ambos grupos de mosquitos fueron mantenidos en el insectario del INSP en las condiciones descritas anteriormente. Nueve días después de la infección con DENV (Salazar et al., 2007) fueron privados de sucrosa por 4 horas para ayunarlos antes de ponerlos en contacto con los murciélagos. Se formaron 5 grupos de mosquitos para el grupo "a" y 5 para el grupo "b", cada uno integrado por 5 hembras infectadas con DENV (Cox et al., 2012). Cada grupo fue colocado en contenedores con mallas mosquiteras, posteriormente 1 murciélago fue introducido dentro de los contenedores, pero fuera de la malla mosquitera (Apéndice 3), de esta forma se permitió que cada grupo de mosquitos se alimentara de los murciélagos hasta que las hembras estuvieran pléoras (20 minutos aproximadamente). Una vez que las hembras *A. aegypti* se alimentaron de los murciélagos, éstos fueron regresados a sus encierros respectivos, y se

mantuvieron hasta el momento de la eutanasia. El programa y calendario de los experimentos se muestran en la Tabla 3.

10. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de la proteína NS1 circulante.

Todos los plasmas colectados de los murciélagos inoculados con DENV (n=38) fueron probados por duplicado para detectar la presencia de la proteína circulante NS1, utilizando el kit comercial Platelia Dengue NS1 Ag (Bio-Rad) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta prueba es un método inmunoenzimático en una etapa de tipo sándwich, en formato microplaca, para la detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en suero o plasma humano.

11. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) por competencia: para la detección de anticuerpos.

Las muestras de plasma de los murciélagos inoculados con DENV (n=22) y mock (n=5) fueron evaluadas para la presencia de inmunoglobulinas específica G (IgG), utilizando los reactivos y materiales proporcionados en el kit Panbio Diagnostics Dengue IgG capture ELISA. Este ensayo comercial es una herramienta diagnóstica para las infecciones por DENV, se basa en la captura de IgG humana mediante anticuerpos anti-IgG humana adherida al plato. Debido a que la IgG de murciélago no fue capturada en el plato (esta prueba se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, sin ningún resultado), se desarrolló una prueba de ELISA por competencia en la cual el plasma de murciélagos y el antígeno DENV1-4, incluido en el kit, fueron incubados durante 1 hora a 37°C (en una dilución final de 1:25). Posteriormente se agregó el anticuerpo monoclonal conjugado a peroxidasa (anti E-Mab HRP) proporcionado también por el kit, esta mezcla fue incubada por 1 hora a 20°-25°C. En paralelo, el control positivo de reacción (un suero humano positivo a IgG, provisto por el kit), fue colocado en el

plato e incubado durante 1 hora a 37°C, una vez concluida esta incubación, se realizaron 6 lavados y se añadió la mezcla del antígeno al plato, el cuál fue cubierto e incubado nuevamente a 37°C por 1 h. Finalmente, después de 6 lavados, se agregaron 100µl de cromógeno TMB (proporcionado por el kit) a cada pozo, después de 10 minutos de incubación a 20°-25°C, la reacción colorimétrica fue detenida al adicionar 100µl de solución de paro. La absorbancia de cada pozo se leyó inmediatamente a una longitud de onda de 450nm. Como controles de competencia, se utilizaron una muestra de suero humano negativo a la prueba para IgG, usando el kit Panbio Dengue IgG Capture ELISA y por prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) ($PRNT_{50} < 20$); y como control positivo, se utilizó un suero positivo de humano para IgG contra DENV con la misma prueba de Panbio y por PRNT, ($PRNT_{50} < 320$). Como control adicional, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti E de ratón (4G2) ($PRNT_{50} = 1,250$). El calibrador, los controles negativos y el control de reacción del kit fueron probados en paralelo como un ensayo de control de calidad. Cualquier lectura menor a tres desviaciones estándar de la media en la densidad óptica (O.D) obtenida con los sueros de humanos negativos, fue tomada como un indicativo de presencia de anti IgG contra DENV en el plasma de los murciélagos.

RESULTADOS

1. Búsqueda por infección de DENV en murciélagos.

Un total de 240 murciélagos de 19 especies diferentes fueron capturados en ambos estados, la Tabla 4 muestra la distribución de las especies capturadas. En el Apéndice 4, se muestran en imagen algunas de ellas. Durante las necropsias de los murciélagos colectados se observaron los órganos en la cavidad torácica y abdominal de forma general y posteriormente fueron extraídos para su observación individual. Durante el procedimiento no se observaron signos de hemorragia ni petequiales en los órganos observados; la coloración, forma y proporción presentaron apariencia normal, estas observaciones sugieren la ausencia de cambios patológicos aparentes. En un caso en particular una hembra *Artibeus jamaicensis* capturada en el estado de Morelos, presentó una masa en la glándula mamaria, y aunque este hallazgo no se relaciona con la presencia del DENV, la masa extirpada fue enviada al departamento de anatomopatología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El resultado histopatológico reporta *Adenoma papilar in situ* (Apéndice 4).

El análisis del RNA por RT-PCR, obtenido de los tejidos del bazo o hígado de los murciélagos colectados, no mostró evidencia de la presencia de RNA viral en los órganos analizados. Estos resultados son confiables considerando que el gen endógeno GAPDH fue correctamente amplificado, como se observa en la Figura 3, donde se muestran como ejemplo, algunas reacciones de RT-PCR realizadas a los órganos de bazo o hígado de los murciélagos capturados en los estados de Campeche y Morelos.

Tabla 4. Especies capturadas y riqueza de especies por estado.

Especie	Estado	
	Morelos	Campeche
<i>Artibeus jamaicensis</i>	104	48
<i>Artibeus lituratus</i>	23	-
<i>Artibeus lituratus</i>	-	2
<i>Artibeus watsoni</i>	-	1
<i>Balantiopteryx plicata</i>	11	-
<i>Carollia perspicillata</i>	-	19
<i>Carollia sowelli</i>	-	3
<i>Chiroderma villosum</i>	-	1
<i>Choeroniscus godmani</i>	-	6
<i>Desmodus rotundus</i>	-	2
<i>Glossofaga commissarisi</i>	-	3
<i>Glossofaga sp.</i>	-	3
<i>Hylonycteris underwoodi</i>	1	-
<i>Hylonycteris godmani</i>	-	1
no identificado	-	1
<i>Pipistrellus hesperus</i>	1	-
<i>Rhogeessa párvula</i>	1	-
<i>Rhogeessa tumida</i>	-	1
<i>Sturnira lilium</i>	4	-
<i>Sturnira ludovici</i>	4	-
Total de Murciélagos capturados	149	91
Riqueza de especies	8	13

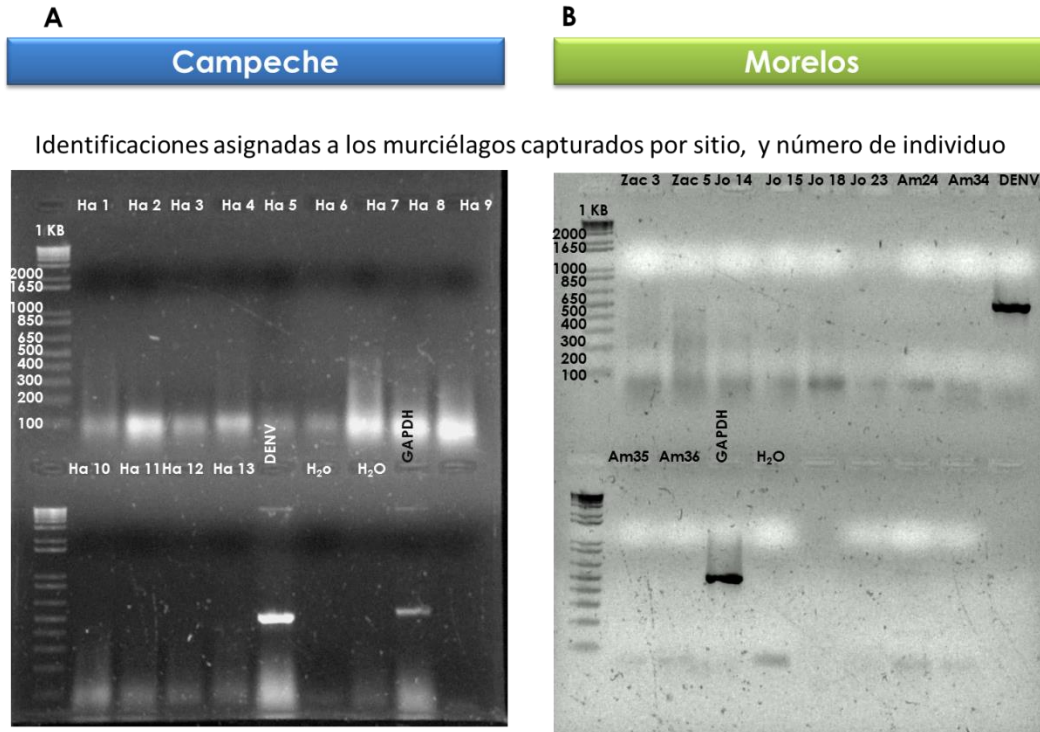


Figura 3. Geles de agarosa con productos amplificados por RT-PCR de los controles positivos: DENV (511pb) y GAPDH (600pb). (A) muestra el resultado negativo a la presencia de RNA viral de 13 individuos capturados en el estado de Campeche. (B) muestra el resultado negativo a la presencia de RNA viral de 10 individuos capturados en el estado de Morelos.

Las muestras homogenizadas y maceradas con DENV-4, mostraron el amplicón correspondiente (511pb), lo cual sugiere que no hubo ninguna inhibición que pudiera atribuirse a los tejidos, ya que fue posible visualizar el amplicon esperado de DENV incluso después de diluirlo hasta 1:100 en ambos tejidos (Figura 4). Estos resultados demuestran que los ensayos de RT-PCR en el presente trabajo fueron realizados eficientemente para la detección del genoma viral, y en caso de que algún murciélago presentara una carga viral baja la técnica utilizada habría sido capaz de detectarla.

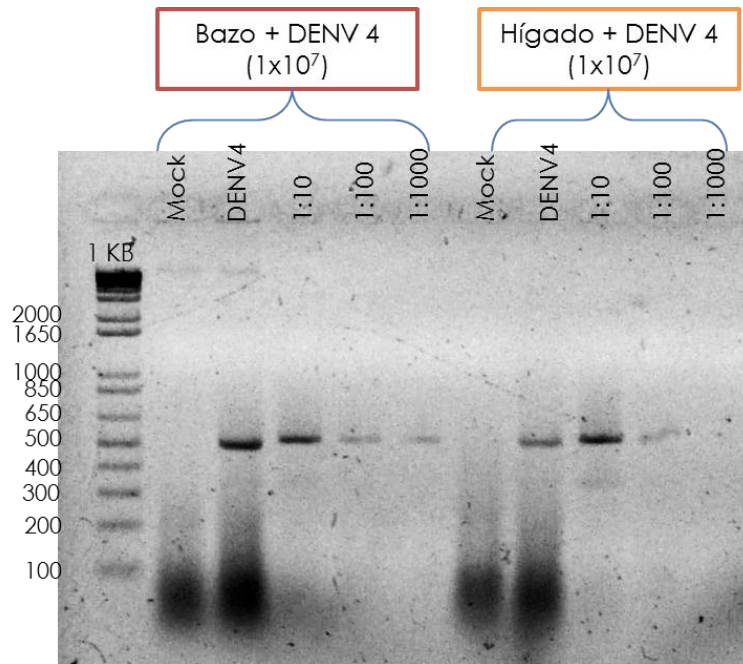


Figura 4. Amplicones obtenidos en el homogenizado de bazo e hígado mezclados con DENV-4. Los órganos fueron macerados y al macerado se añadieron 50 μ l con virus extraído de cerebro de ratón neonato. Los cDNA se diluyeron 10X en agua y analizados por PCR para la detección del genoma viral (amplicón 511 pb).

2. Evaluación de los plasmas de murciélagos para IgG anti dengue.

Un total de 202 plasmas de murciélagos capturados en los estados de Morelos y Campeche fueron analizados para la detección de anticuerpos contra DENV por PRNT; sin embargo no se observó disminución en el número de focos para el DENV-4 generada por los plasmas de murciélagos capturados y tampoco en la muestra control de suero humano negativo para IgG anti DENV ($PRNT_{50} \leq 1:20$). La muestra utilizada de suero de humano IgG positivo contra DENV mostró una $PRNT_{50} = 320$, y el anticuerpo monoclonal neutralizante que reconoce la proteína E de los 4 serotipos de dengue (4G2) mostró una $PRNT_{50} = \geq 800$. Estos resultados sugieren la ausencia de anticuerpos neutralizantes contra el DENV en los plasmas de murciélagos capturados. Lo anterior sugiere que los murciélagos no estuvieron

expuestos a una infección por el DENV previa al muestreo que haya estimulado una respuesta inmune contra el virus.

Los resultados anteriores muestran que los murciélagos capturados en ambos estados no presentaron infección activa al momento de la captura, en ellos, tampoco se observaron evidencias sugerentes de una infección por DENV en el pasado, aun cuando hay reportes de caso de dengue en humanos simultáneos a la época y zonas de muestreo.

3. Inoculación experimental de murciélagos con DENV.

52 murciélagos *Artibeus jamaicensis* fueron capturados para llevar a cabo las inoculaciones experimentales, utilizando diferentes serotipos del DENV y vías de inoculación. Los diseños experimentales planteados en este estudio abarcaron periodos de tiempo en donde proceso de infección y la sintomatología es evidente en pacientes humanos, sin embargo a lo largo de las diferentes inoculaciones experimentales, no se observaron cambios en los patrones de comportamiento, los cuales podrían observarse como aislamiento o ausencia de vuelo ante la presencia del manejador, tampoco se registraron alteraciones en el patrón de alimentación ya que nunca hubo una disminución en el consumo de fruta. Si bien identificar signos clínicos de enfermedad en mamíferos silvestres es poco común, existen cambios en la apariencia física de los animales que pueden interpretarse como signos clínicos, tales como cambios en la apariencia del pelo, vuelo errático, encorvamiento, debilidad o letargia, sin embargo ninguno de estos signos fue observado los murciélagos inoculados con DENV indistintamente de las rutas de inoculación o serotipo utilizado, aunado a esto, no se observaron cambios patológicos aparentes durante los procesos de necropsia.

4. Evaluación de plasma y tejido para genomas virales

En el análisis de los extractos de RNA mediante RT-PCR de plasma y bazo de los murciélagos experimentalmente inoculados por cualquiera de las rutas o

mediante la exposición directa a la picadura de mosquitos infectados, no se observó evidencia de viremia o la presencia de ácidos nucleicos de DENV en los órganos procesados (Tabla 5). La muestra procesada del bazo del murciélago 8 de IE-1 eutanasiado al día 7 post inoculo, mostró un amplicón débil de ~500 pares de bases después de la prueba de PCR. Amplicones similares fueron observados en los bazos de los murciélagos 13, 16 y 18 de IE-2 eutanasiados los días 4, 7 y 9 y en los murciélagos 25 y 28 de IE-3 eutanasiados los días 10 y 12. Finalmente, también se observaron amplicones débiles en los murciélagos 2a y 5a del E-4 en los días 7 y 17 post-inoculación. Sin embargo estos resultados no pudieron ser reproducidos después de utilizar el cDNA original o un nuevo cDNA del mismo tejido. Por otra parte los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a (MacroGen®), para su secuenciación, y las secuencias obtenidas fueron comparadas por un ensayo de BLAST en (ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) Los datos obtenidos indicaron que los amplicones referentes a DENV eran de naturaleza espuria (Tabla 6). En contraste, la amplificación de GAPDH mRNA realizada en paralelo como control de extracción de ácidos nucleicos para cada muestra, claramente mostró el tamaño esperado de 600 pares de bases. Estos resultados indican que no existió replicación viral en los murciélagos inoculados con DENV.

Tabla 6. Secuencias obtenidas a partir de los productos de PCR de las inoculaciones experimentales (IE).

Secuencia obtenida por Macrogen de los amplicones enviados	% de Identidad	Descripción	Número de acceso en GenBank
DENV 1. (Inoculo)	95%	Dengue virus 1, cepa Hawaii	KM204119.1
DENV 4 (Inoculo)	98%	Dengue virus 4, cepa H241	AY947539.1
Murciélago 8 (IE1)	No se encontraron secuencias similares		
Murciélago 13 (IE2)	No se encontraron secuencias similares		
Murciélago 16 (IE2)	No se encontraron secuencias similares		
Murciélago 18 (IE2)	96%	Homo sapiens tyrosine kinase	KJ420609.1
Murciélago 2a (IE-4)	95%	Pan troglodytes ABL proto-oncogene 1, non-receptor	XM_001166213.4
Murciélago 5a (IE-4)	77%	Homo sapiens isolate PTS2010 mutant BCR/ABL fusion protein mRNA, partial cds	JF272500.1

Los amplicones obtenidos por PCR de las muestras de los murciélagos y de los controles de DENV utilizados fueron enviados a Macrogen®, para su secuenciación, las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante un ensayo de BLAST con posibles secuencias en ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

5. Evaluación de antigenemia (NS1) en el plasma de murciélagos inoculados.

La presencia de NS1 circulante fue evaluada por ELISA en el plasma obtenido de los murciélagos inoculados y de los murciélagos Mock (como control negativo) considerando que la cinética de la antigenemia con respecto a la viremia en estos individuos no podía predecirse, todos los plasma fueron probados para la presencia de NS1 independientemente de los resultados de RT-PCR. Lecturas ligeramente superiores a las del valor de corte del ensayo, fueron observadas en el plasma de murciélagos en IE-1 e IE-2 al día 7 post inoculación y también en el

plasma obtenido los días 16 y 17 en murciélagos de IE-4 (Tabla 5). Aunado a esto, se observaron lecturas con una fuerte densidad óptica (D.O) en el plasma obtenido en 2 murciélagos sacrificados los días 1 (murciélagos 19 y 20) y 4 (murciélagos 21 y 22), sin embargo los niveles de NS1 circulantes no fueron detectables en el plasma obtenido en tiempos tardíos (7, 10 y 12) en el mismo experimento IE-3. Estos resultados sugieren que no existió una antigenemia de NS1 sostenida después de la inoculación experimental de murciélagos independientemente del serotipo utilizado. Finalmente, uno de los grupos de mosquitos alimentado con la sangre fresca del murciélagos 19 de la IE-3, eutanaciado el día 1 post-inoculación, resultó positivo a la presencia de NS1. Sin embargo, los grupos de mosquitos alimentados con sangre del murciélago Mock sacrificado el mismo día y en días posteriores resultaron negativos a la presencia de NS1, este hallazgo puede deberse a que la NS1 detectada en el macerado de este grupo de mosquitos corresponda al inóculo y no a una producción de *novo*.

6. Evaluación de la presencia de anticuerpos IgG en el plasma de murciélagos inoculados.

En las cuatro IE realizadas se obtuvieron muestras a lo largo de tiempos tempranos (24 horas post inoculación) hasta tiempos más tardíos (17 días) de forma tal, que la producción de anticuerpos IgG anti dengue sería visible; o bien de haber existido una memoria inmunológica contra el DENV, las inoculaciones experimentales habrían sido capaces de estimular nuevamente la presencia de anticuerpos (generados tras una infección secundaria). Sin embargo en la prueba de ELISA por competencia para detectar la presencia de anticuerpos específicos IgG contra DENV, ninguna muestra de plasma de murciélagos inoculados y Mock generaron reducción en la densidad óptica (D.O) (la lectura media de D.O de 1.168 ± 0.066) como tampoco se observó en el suero humano negativo para IgG anti DENV contra, el cual generó una lectura media de D.O 1.061 ± 0.049 . En contraste, se observó una reducción de más del 98% en la D.O observada en el suero humano positivo a IgG (0.022 ± 0.010) y anti-E Mab (0.009 ± 0.004) incluidos

como controles positivos. Estos resultados sugieren que no existió respuesta inmune inducida por la inoculación de DENV en los murciélagos *Artibeus jamaicensis*.

DISCUSIÓN

Los murciélagos son reservorios naturales de un gran número de virus, algunos de ellos de importancia para la salud pública. Recientemente análisis de metagenómica han identificado virus pertenecientes a las familias *Retroviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Picobirnaviridae*, y *Flaviviridae*, entre otras, como parte del viroma de los murciélagos (Epstein et al., 2010, Donaldson et al., 2010, Dacheux et al., 2014, He et al., 2013, Wu et al., 2012). El Dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más importante que afecta a los humanos. La Implementación de medidas de control para esta enfermedad, es tan necesaria para la salud pública, como también lo es un claro entendimiento del ciclo de vida del DENV en la naturaleza, incluyendo la identificación de posibles reservorios naturales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de diferentes especies de murciélagos a infecciones por DENV. En este estudio no se encontró evidencia de infección activa o pasada por DENV en las 19 especies de murciélagos capturadas, algunas de ellas en zonas con actividad concomitante de DENV en humanos. Los ensayos de RT-PCR realizados en este estudio, fueron respaldados con el uso adecuado de controles de reacción como fueron la amplificación del gen GAPDH y los homogenizados de órganos de murciélagos con DENV que demostraron que no hay presencia de inhibidores en la extracción de RNA, ni en la reacción de PCR. Estos resultados contrastan con previos estudios realizados en México, los cuales sugieren infección activa basado en la detección por RT-PCR de ácidos nucleicos de DENV en murciélagos *Artibeus jamaicensis* y *Artibeus lituratus* (Aguilar-Setien et al., 2008, Sotomayor-Bonilla et al., 2014). También han sido reportados la presencia de títulos bajos de anticuerpos neutralizantes contra

DENV en suero de murciélagos *Artibeus jamaicensis*, *Artibeus lituratus* y *Glossophaga soricina*, (Machain-Williams et al., 2013).

Los eventos ecológicos que dirigen las interacciones entre patógenos y nuevos hospederos y la transmisión de patógenos entre especies, pueden ocurrir en diversas escalas de tiempo, espacio y organización ecológica, de igual manera pueden ocurrir debido a procesos evolutivos dentro del hospedero, o por uso de suelo y cambio climático (Plowright et al., 2015). Considerando que las especies de murciélagos reportadas como infectadas por DENV en estudios previos también se encuentran representadas en este estudio, la posible causa biológica para explicar las discrepancias entre estos resultados podría estar relacionada con factores ambientales que hayan favorecido la infección por DENV, con las características intrínsecas de las poblaciones de murciélagos muestreadas o bien con la habilidad replicativa del serotipo viral que circula en cada zona de muestro (Pepin y Hanley, 2008, Peterson, 2008).

Para las inoculaciones experimentales se consideró el uso de la especie *Artibeus jamaicensis* como modelo experimental debido a que es una especie abundante, de hábitos frugívoros, lo que facilita su mantenimiento en cautiverio, y tolerante a la perturbación del hábitat (Medellín et al., 2000). Ello permite que *A. jamaicensis* cohabite con humanos en zonas rurales y semi-rurales donde el DENV es endémico. Además existe evidencia que reportan la infección de DENV en murciélagos silvestres del género *Artibeus planirostris* (de Thoisy et al., 2009).

En la IE-1, la vía subcutánea de inoculación de DENV-4 fue utilizada con la intención de generar una infección localizada de las células del sistema inmune residentes de la piel (Martina et al., 2009), ya que se sabe que las células dendríticas y los macrófagos residentes de la piel son los primeras células que salen al encuentro del DENV después de la infección natural por picadura de mosquito. (Kyle et al., 2007). La ruta subcutánea ha sido empleada exitosamente en ratones humanizados utilizados como modelos de infección con DENV (Rothman, 2011), también ha sido utilizada para inoculaciones experimentales en murciélagos con virus del Oeste del Nilo, (WNV) y virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) (Davis et al., 2005, van den Hurk et al., 2009). En vista de los resultados

obtenidos después de la IE-1, se cambió la vía de inoculación subcutánea por la vía intraperitoneal con la finalidad de aumentar la absorción del virus con el mismo serotipo en la IE-2. Esta vía ha sido utilizada en protocolos experimentales para inocular ratones y murciélagos con DENV y otros flavivirus (Watanabe et al., 2010, Perea-Martinez et al., 2013). Sin embargo, no se encontró evidencia de antigenemia, viremia, o respuesta serológica inmune después de las IE-1 y las IE-2. Se ha reportado que el órgano del bazo puede ser infectado por el DENV en humano (Jessie et al., 2004) y murciélagos (de Thoisy et al., 2009), aunque en los análisis realizados en el bazo de los murciélagos inoculados experimentalmente no mostraron evidencia en la replicación del virus.

En un estudio realizado por Barr et al., (2012), en el cual diferentes líneas celulares de mamíferos, incluyendo células TB Lu I, de epitelio pulmonar derivadas de murciélagos *Tadarida brasiliensis*, fueron infectadas *in vitro* con los cuatro serotipos de DENV, sólo el DENV-1 mostró evidencia de infección en estas células, la cual fue observada a las 72 h.p.i por qRT-PCR. Aunado a esto, secuencias de DENV-1 han sido aisladas en murciélagos capturados en zonas peri-urbanas de la Guyana Francesa (de Thoisy et al., 2009). Por tales antecedentes, el DENV-1 fue utilizado como inóculo en la IE-3. Además debido a la falta de datos de la cinética de infección del DENV en murciélagos, el seguimiento en el periodo de observación post-inoculación se fue extendido de 9 a 12 días. Si bien no se observó evidencia de viremia ni replicación viral en el bazo de los murciélagos inoculados, el plasma colectado los días 1 y 4 post inóculo mostró valores positivos para NS1 (antigenemia); se sabe que los niveles de esta proteína incrementan rápidamente en el suero de pacientes durante la fase aguda de la enfermedad y disminuye después de los días 7 de haber iniciado la fiebre. (Alcon et al., 2002, Young et al., 2000). Sin embargo, los niveles de antigenemia usualmente se presentan en paralelo con los niveles de viremia en pacientes. Por lo tanto, en ausencia de cualquier evidencia de viremia, los resultados son difíciles de entender.

De la presencia de NS1 en el plasma de estos murciélagos, debido a que título del inóculo de DENV-1 utilizado fue 3 veces más alto que el título de DENV-4 y el ensayo de Platelia Dengue NS1 es mucho más sensible detectando NS1 del DENV-

1 que de DENV-4 (Ramirez et al., 2009), la posibilidad de que la NS1, detectada en el plasma de murciélagos del ensayo IE-3, corresponda al inóculo, es loable. Es importante resaltar que los mosquitos, alimentados con la sangre de los murciélagos 19-22, también resultaron positivos a NS1.

La saliva de los mosquitos tiene una importante función al incrementar la infección del DENV en el hospedero vertebrado (Cox et al., 2012, Conway et al., 2014, Surasombatpattana et al., 2013, Ader et al., 2004). Por consiguiente, para las IE-4 se implementaron las infecciones de los murciélagos mediante la picadura de mosquitos previamente infectados con los serotipos DENV-1 y 4, en este diseño experimental los murciélagos fueron observados hasta 17 días posteriores a la exposición a los mosquitos. Se sabe que los mosquitos *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, son altamente susceptibles a la infección por virus dengue; la cinética de la infección de los mosquitos fue seguida por RT-PCR, basados en estudios previos (Salazar et al., 2007), y no se observaron diferencias en la cinética de infección entre el DENV 1 y DENV-4. El número infectado de mosquitos por murciélago (n=5) fue reportado como suficiente por Cox y et al., (2012) para infectar ratones humanizados y las hembras *A. aegypti* sólo fueron retiradas hasta que estuvieran plétoras de alimento. A pesar de todas estas precauciones y controles, no se observaron evidencias de viremia o replicación viral en los órganos en cualquiera de los murciélagos de IE-4, aun cuando la cepa de mosquitos utilizada es altamente susceptible para detectar o inducir infección por DENV.

La falta de infección de los murciélagos en las IE 1 a 3 no parece deberse a la deficiencia en la calidad o cantidad del inóculo, ya que la viabilidad de los inóculos fue corroborado en paralelo en ratones neonatos y la cantidad de virus usado en cada inóculo (10^3 a 10^4 UFP/murciélago) es similar o comparable al inóculo utilizado para inocular ratones (Zompi y Harris, 2012). Además la detección de mRNA a partir del gen GAPDH amplificado del tejido del bazo, indican el apropiado proceso de extracción de ácidos nucleicos y de los protocolos de amplificación, asimismo, no se observaron cambios aparentes en los hábitos alimenticios ni en el comportamiento durante los experimentos.

Los resultados de las inoculaciones experimentales presentadas en este trabajo coinciden con los reportados previamente por Perea-Martinez et al., (2013), después de inocular intraperitonealmente con DENV-2 a 27 murciélagos *Artibeus intermedius*. Nuestros resultados también son comparables con reportes previos de inoculación experimental de 2 especies de murciélagos (*Tadarida brasiliensis* y *Eptesicus fuscus*) con WNV, o la inoculación de zorros voladores australianos (*Pteropus alecto*) con JEV, ambos flavivirus cercanamente relacionados al DENV, y otro estudio de inoculación experimental a murciélagos (*Rousettus leschenaultii*) con virus Yokose, un flavivirus con una relación distante a DENV (van den Hurk et al., 2009, Davis et al., 2005, Watanabe et al., 2010). No obstante, en el trabajo realizado por Sulkin et al., (1963) se observó niveles bajos a relativamente altos de susceptibilidad a la infección con cepas de JEV o SLEV en murciélagos *Tadarida brasiliensis mexicana*, *Myotis lucifugus*, y *Eptesicus fuscus* inoculados.

Una de las limitantes en los ensayos de inoculación experimental en los murciélagos *Artibeus jamaicensis* capturados en campo, fue no realizar pruebas para detectar la presencia de anticuerpos anti-DENV que pudieran sugerir infecciones previas con DENV. Sin embargo, si estos murciélagos hubieran estado involucrados en infecciones pasadas con DENV, cabría esperar la activación de la memoria inmunológica y una respuesta de IgG después de las inoculaciones con DENV pero ello no se observó. En el mismo orden de ideas, en caso de una reacción cruzada originada por infecciones pasadas por flavivirus, transmitidos por otros vectores, la presencia de anticuerpos también debería observarse, por lo tanto la evidencia mostrada en este trabajo sugiere que los murciélagos *Artibeus jamaicensis* no son capaces de sostener una replicación del DENV. Finalmente también es pertinente considerar que existan características biológicas, fisiológicas y ecológicas que no pueden ser reproducibles en condiciones en cautiverio y por lo tanto desfavorables para simular la infección de los murciélagos con DENV.

En la emergencia de los flavivirus, la expansión geográfica y urbanización han jugado un rol importante en la adaptación inicial y el establecimiento de brotes epidémicos en zonas endémicas. Teniendo en cuenta la creciente presión

ecológica ocasionada por la pérdida de bosques tropicales, resulta importante considerar que las cepas de DENV provenientes de ciclos urbanos puedan invadir o establecer ciclos selváticos, lo cual resultaría en un evento epidemiológicamente relevante (Vasilakis et al., 2011). Considerando que el género *Flavivirus* posee muchos virus asociados a la emergencia y re-emergencia de enfermedades en humanos, la presencia del DENV en murciélagos puede resultar en un cuello de botella genético que logre afectar la dinámica de infección (Coffey et al., 2013)

Es importante considerar que la probabilidad de capturar murciélagos infectados con dengue puede ser menos probable que los murciélagos realmente sean huéspedes incidentales, por lo tanto, los estudios relacionados con la búsqueda de DENV en especies silvestres como murciélagos deben mostrar evidencia contundente que indique la presencia o ausencia del virus en estos posibles nuevos hospederos ya que la reacción cruzada que existe entre aproximadamente 70 miembros de la familia *Flaviviridae* está bien documentada (Vaughan et al., 2010).

El salto de una infección entre especies es un proceso de evolución adaptativa que puede ser visto como el movimiento de una población viral a través del paisaje, ya que el proceso de emergencia involucra múltiples pasos incluyendo la invasión y persistencia del agente viral (con o sin causar signos de enfermedad) en un nuevo hospedero y la transmisión del agente viral a otros hospederos susceptibles antes de que el sistema inmune elimine la infección o antes de que muera el hospedero (Keesing et al., 2010, Schountz, 2014, Plowright et al., 2015)

Considerando que el dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más importante para la salud pública con dos ciclos, urbano y selvático, que mantienen la circulación del virus en más de 100 países en zonas tropicales y subtropicales, donde se estima que más de 100 millones de casos son reportados anualmente, el diagnóstico del DENV en humanos debe de ser certero, contundente, eficaz y debe reunir información importante como la historia clínica, estudios epidemiológicos, de laboratorio, moleculares e incluso estudios filogenéticos que permitan conocer el comportamiento del virus en zonas

endémicas; de la misma forma, en la búsqueda del DENV en murciélagos es necesario integrar análisis espaciales, modelos de predicción espacio-temporal del DENV, estudios de metagenómica, o inoculaciones experimentales con virus wild type que permitan discernir el rol de los murciélagos en el ciclo ecológico del virus, especialmente al considerar que las interacciones patógeno-vector-hospedero no son fenómenos aislados y que es probable que el orden *Chiroptera* pueda tolerar algunas infecciones virales y sobrevivir a infecciones potencialmente importantes para la salud pública (Baker et al., 2013, Schountz, 2014, McMurray et al., 1982). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, existe la posibilidad de que los murciélagos sean capaces de coexistir con el DENV y con ello, hayan desarrollado mecanismos eficientemente capaces de controlar la replicación viral (Baker et al., 2013, Moratelli and Calisher, 2015, Brook and Dobson, 2015).

CONCLUSIONES

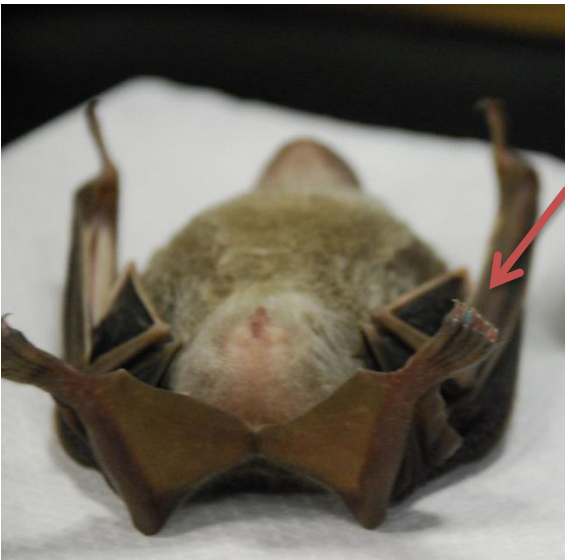
1. Las poblaciones de murciélagos muestreadas en zonas de actividad concomitante de DENV en los estados de Morelos y Campeche no mostraron evidencia de infección por DENV.
2. Los resultados obtenidos de las inoculaciones experimentales realizadas en este estudio sugieren que la especie *Artibeus jamaicensis* es incapaz de sostener la replicación del DENV.
3. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la transmisión y establecimiento de la infección por DENV en poblaciones de murciélagos es incierta.

PERSPECTIVAS

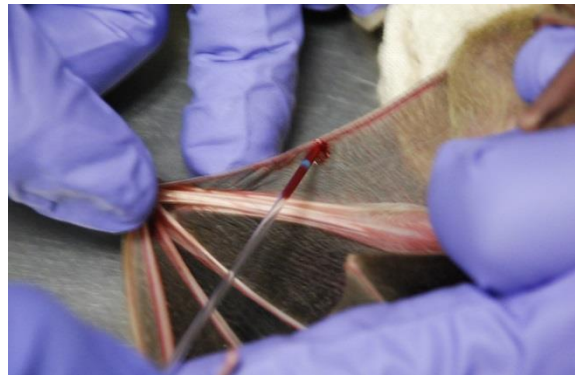
1. Realizar nuevos ensayos de inoculación experimental que incluyan aislados de DENV wild type.
2. Hacer análisis de metagenómica que permitan conocer la posible diversidad viral de los murciélagos capturados.
3. Realizar estudios de modelación espacio-temporal que permitan predecir la presencia de casos de DENV en murciélagos.

APÉNDICE.

A



B



Apéndice 1. Toma de muestras biológicas. **(A)** Asignación de marca en las uñas de los pies para la identificación individual de los murciélagos utilizados en las Inoculaciones experimentales. **(B)** Toma de muestra de sangre por punción de la vena cefálica y recolección en tubos capilares heparinizados.

A



B



Apéndice 2. Manejo en cautiverio de murciélagos. **(A)** Encierros de 1 m³ contruidos con tubos de PVC de 1.5 pulgadas de diámetro y conectores de PVC, cubierto con malla sombra. **(B)** Murciélagos *Artibeus jamaicensis* dentro de los encierros



Apéndice 3. Inoculación por picadura de mosquito en IE 4. Diseño del contenedor donde fueron colocados los mosquitos infectados oralmente y los murciélagos *Artibeus jamaicensis* *Aedes aegypti* a murciélagos en la IE4.



Choeroniscus godmani



Artibeus jamaicensis



Artibeus lituratus



Balantiopteryx plicata



Carollia perspicillata



Sturnira lilium

Apéndice 4 Imágenes de las especies más abundantes en las colectas realizadas en los estados de Morelos y Campeche.

A



B



Apéndice 5. Imágenes de la hembra *Artibeus jamaicensis* con Adenoma papilar *in situ*, capturada en el Estado de Morelos. **(A)** Masa tumoral que abarca la región de la glándula mamaria izquierda y se extiende hacia craneal. **(B)** Aspecto macroscópico de la masa tumoral.

REFERENCIAS

ADER, D. B., CELLUZZI, C., BISBING, J., GILMORE, L., GUNTHER, V., PEACHMAN, K. K., RAO, M., BARVIR, D., SUN, W. & PALMER, D. R. 2004. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. *Viral immunology*, 17, 252-265.

AGUILAR-SETIEN, A., ROMERO-ALMARAZ, M. L., SANCHEZ-HERNANDEZ, C., FIGUEROA, R., JUAREZ-PALMA, L. P., GARCIA-FLORES, M. M., VAZQUEZ-SALINAS, C., SALAS-ROJAS, M., HIDALGO-MARTINEZ, A. C., PIERLE, S. A., GARCIA-ESTRADA, C. & RAMOS, C. 2008. Dengue virus in Mexican bats. *Epidemiol Infect*, 136, 1678-83.

ALCON, S., TALARMIN, A., DEBRUYNE, M., FALCONAR, A., DEUBEL, V. & FLAMAND, M. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*, 40, 376-81.

BACK, A. T. & LUNDKVIST, A. 2013. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol*, 3.

BAKER, M. L., SCHOUNTZ, T. & WANG, L. F. 2013. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health*, 60, 104-16.

BARR, K. L., ANDERSON, B. D., HEIL, G. L., FRIARY, J. A., GRAY, G. C. & FOCKS, D. A. 2012. Dengue serotypes 1--4 exhibit unique host specificity in vitro. *Virus Adaptation & Treatment*, 4.

BROOK, C. E. & DOBSON, A. P. 2015a. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol*, 23, 172-180.

CALISHER, C. H., CHILDS, J. E., FIELD, H. E., HOLMES, K. V. & SCHOUNTZ, T. 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev*, 19, 531-45.

CEBALLOS, G. & OLIVA, G. 2005. Los mamíferos silvestres de México, Fondo de Cultura Económica.

COFFEY, L. L., FORRESTER, N., TSETSARKIN, K., VASILAKIS, N. & WEAVER, S. C. 2013a. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol*, 8, 155-76.

COFFEY, L. L., FORRESTER, N., TSETSARKIN, K., VASILAKIS, N. & WEAVER, S. C. 2013b. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future microbiology*, 8, 155-176.

CONWAY, D. J. & ROPER, C. 2000. Micro-evolution and emergence of pathogens. *Int J Parasitol*, 30, 1423-30.

CONWAY, M. J., WATSON, A. M., COLPITTS, T. M., DRAGOVIC, S. M., LI, Z., WANG, P., FEITOSA, F., SHEPHERD, D. T., RYMAN, K. D. & KLIMSTRA, W. B. 2014. Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host. *Journal of virology*, 88, 164-175.

COX, J., MOTA, J., SUKUPOLVI-PETTY, S., DIAMOND, M. S. & RICO-HESE, R. 2012. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. *J Virol*, 86, 7637-49.

DACHEUX, L., CERVANTES-GONZALEZ, M., GUIGON, G., THIBERGE, J. M., VANDENBOGAERT, M., MAUFRAIS, C., CARO, V. & BOURHY, H. 2014. A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One*, 9, e87194.

DANTÉS, H. G., FARFÁN-ALE, J. A. & SARTI, E. 2014. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Mexico (2000–2011): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 8, e3158.

DAVIS, A., BUNNING, M., GORDY, P., PANELLA, N., BLITVICH, B. & BOWEN, R. 2005. Experimental and natural infection of North American bats with West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg*, 73, 467-9.

DE THOISY, B., LACOSTE, V., GERMAIN, A., MUNOZ-JORDAN, J., COLON, C., MAUFFREY, J. F., DELAVAL, M., CATZEFLIS, F., KAZANJI, M., MATHEUS, S., DUSSART, P.,

MORVAN, J., SETIEN, A. A., DEPARIS, X. & LAVERGNE, A. 2009. Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9, 157-70.

DOBSON, A. P. 2005. Virology. What links bats to emerging infectious diseases? *Science*, 310, 628-9.

DONALDSON, E. F., HASKEW, A. N., GATES, J. E., HUYNH, J., MOORE, C. J. & FRIEMAN, M. B. 2010. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J Virol*, 84, 13004-18.

EPSTEIN, J. H., QUAN, P. L., BRIESE, T., STREET, C., JABADO, O., CONLAN, S., ALI KHAN, S., VERDUGO, D., HOSSAIN, M. J., HUTCHISON, S. K., EGHOLM, M., LUBY, S. P., DASZAK, P. & LIPKIN, W. I. 2010. Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old world frugivorous bats (*Pteropus giganteus*) in Bangladesh. *PLoS Pathog*, 6, e1000972.

FENTON, M. & SIMMONS, N. 2015. *Bats, a world of science and mystery*. The University of Chicago Press, Chicago.

FRANCO, L., PALACIOS, G., MARTINEZ, J. A., VÁZQUEZ, A., SAVJI, N., DE ORY, F., SANCHEZ-SECO, M. P., MARTÍN, D., LIPKIN, W. I. & TENORIO, A. 2011. First report of sylvatic DENV-2-associated dengue hemorrhagic fever in West Africa. *PLoS neglected tropical diseases*, 5, e1251.

GAUNT, M. W., SALL, A. A., DE LAMBALLERIE, X., FALCONAR, A. K., DZHIVANIAN, T. I. & GOULD, E. A. 2001. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol*, 82, 1867-76.

GEBHARD, L. G., FILOMATORI, C. V. & GAMARNIK, A. V. 2011. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*, 3, 1739-56.

GUZMAN, M. G., HALSTEAD, S. B., ARTSOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D. J., HUNSPERGER, E., KROEGER, A., MARGOLIS, H. S., MARTINEZ, E., NATHAN, M. B., PELEGRINO, J. L., SIMMONS, C., YOKSAN, S. & PEELING, R. W. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, 8, S7-16.

HAYMAN, D. T., BOWEN, R. A., CRYAN, P. M., MCCRACKEN, G. F., O'SHEA, T. J., PEEL, A. J., GILBERT, A., WEBB, C. T. & WOOD, J. L. 2013. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health*, 60, 2-21.

HE, B., YANG, F., YANG, W., ZHANG, Y., FENG, Y., ZHOU, J., XIE, J., BAO, X., GUO, H., LI, Y., XIA, L., LI, N., MATTHIJNSSENS, J., ZHANG, H. & TU, C. 2013. Characterization of a novel G3P[3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses. *J Virol*, 87, 12357-66.

JESSIE, K., FONG, M. Y., DEVI, S., LAM, S. K. & WONG, K. T. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*, 189, 1411-8.

KEESING, F., BELDEN, L. K., DASZAK, P., DOBSON, A., HARVELL, C. D., HOLT, R. D., HUDSON, P., JOLLES, A., JONES, K. E., MITCHELL, C. E., MYERS, S. S., BOGICH, T. & OSTFELD, R. S. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468, 647-52.

KLUNGTHONG, C., PUTNAK, R., MAMMEN, M. P., LI, T. & ZHANG, C. 2008. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J Virol Methods*, 154, 175-81.

KUNO, G. 2001. Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Rev Med Virol*, 11, 165-90.

KYLE, J. L., BEATTY, P. R. & HARRIS, E. 2007. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *J Infect Dis*, 195, 1808-17.

LAMBRECHTS, L., FANSIRI, T., PONGSIRI, A., THAISOMBOONSUK, B., KLUNGTHONG, C., RICHARDSON, J. H., PONLAWAT, A., JARMAN, R. G. & SCOTT, T. W. 2012. Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. *J Virol*, 86, 1853-61.

LANCIOTTI, R. S., CALISHER, C. H., GUBLER, D. J., CHANG, G. J. & VORNDAM, A. V. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30, 545-51.

LUDERT, J. E., MOSSO, C., CEBALLOS-OLVERA, I. & DEL ANGEL, R. M. 2008. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virology*, 5, 51.

MACHAIN-WILLIAMS, C., LOPEZ-URIBE, M., TALAVERA-AGUILAR, L., CARRILLO-NAVARRETE, J., VERA-ESCALANTE, L., PUERTO-MANZANO, F., ULLOA, A., FARFAN-ALE, J. A., GARCIA-REJON, J., BLITVICH, B. J. & LORONO-PINO, M. A. 2013. Serologic evidence of flavivirus infection in bats in the Yucatan Peninsula of Mexico. *J Wildl Dis*, 49, 684-9.

MARTINA, B. E., KORAKA, P. & OSTERHAUS, A. D. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*, 22, 564-81.

MCMURRAY, D. N., STROUD, J., MURPHY, J. J., CARLOMAGNO, M. A. & GREER, D. L. 1982. Role of immunoglobulin classes in experimental histoplasmosis in bats. *Developmental & Comparative Immunology*, 6, 557-567.

MEDELLIN, R. A., ARITA, H. T. & SÁNCHEZ H, O. 2008. Identificación de los Murciélagos de México. *Claves de campo*, México, Instituto de Ecología, UNAM.

MEDELLÍN, R. A., EQUIHUA, M. & AMIN, M. A. 2000. Bat Diversity and Abundance as Indicators of Disturbance in Neotropical Rainforests

Diversidad y Abundancia de Murciélagos como Indicadores de Perturbaciones en Selvas Húmedas Neotropicales. Conservation Biology, 14, 1666-1675.

MORATELLI, R. & CALISHER, C. H. 2015. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110, 1-22.

MORENO-GARCIA, M., LANZ-MENDOZA, H. & CORDOBA-AGUILAR, A. 2010. Genetic variance and genotype-by-environment interaction of immune response in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 47, 111-20.

- NEUWEILER, G. 2000. The biology of bats, Oxford University Press.
- PARRISH, C. R., HOLMES, E. C., MORENS, D. M., PARK, E. C., BURKE, D. S., CALISHER, C. H., LAUGHLIN, C. A., SAIF, L. J. & DASZAK, P. 2008. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 457-70.
- PEPIN, K. M. & HANLEY, K. A. 2008. Density-dependent competitive suppression of sylvatic dengue virus by endemic dengue virus in cultured mosquito cells. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8, 821-8.
- PEREA-MARTINEZ, L., MORENO-SANDOVAL, H. N., MORENO-ALTAMIRANO, M. M., SALAS-ROJAS, M., GARCIA-FLORES, M. M., ARECHIGA-CEBALLOS, N., TORDO, N., MARIANNEAU, P. & AGUILAR-SETIEN, A. 2013. Experimental infection of *Artibeus intermedius* bats with serotype-2 dengue virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36, 193-8.
- PETERSON, A. T. 2008. Biogeography of diseases: a framework for analysis. *Naturwissenschaften*, 95, 483-91.
- PLATT, K. B., MANGIAFICO, J. A., ROCHA, O. J., ZALDIVAR, M. E., MORA, J., TRUEBA, G. & ROWLEY, W. A. 2000. Detection of dengue virus neutralizing antibodies in bats from Costa Rica and Ecuador. *J Med Entomol*, 37, 965-7.
- PLOWRIGHT, R. K., EBY, P., HUDSON, P. J., SMITH, I. L., WESTCOTT, D., BRYDEN, W. L., MIDDLETON, D., REID, P. A., MCFARLANE, R. A., MARTIN, G., TABOR, G. M., SKERRATT, L. F., ANDERSON, D. L., CRAMERI, G., QUAMMEN, D., JORDAN, D., FREEMAN, P., WANG, L. F., EPSTEIN, J. H., MARSH, G. A., KUNG, N. Y. & MCCALLUM, H. 2015. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc Biol Sci*, 282, 20142124.
- RAMIREZ, A., FAJARDO, A., MOROS, Z., GERDER, M., CARABALLO, G., CAMACHO, D., COMACH, G., ALARCON, V., ZAMBRANO, J., HERNANDEZ, R., MORATORIO, G., CRISTINA, J. & LIPRANDI, F. 2010. Evolution of dengue virus type 3 genotype III in Venezuela: diversification, rates and population dynamics. *Virology*, 7, 329.
- RAMIREZ, A. H., MOROS, Z., COMACH, G., ZAMBRANO, J., BRAVO, L., PINTO, B., VIELMA, S., CARDIER, J. & LIPRANDI, F. 2009. Evaluation of dengue NS1 antigen

detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 65, 247-53.

ROTHMAN, A. L. 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*, 11, 532-43.

SALAZAR, M. I., RICHARDSON, J. H., SANCHEZ-VARGAS, I., OLSON, K. E. & BEATY, B. J. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*, 7, 9.

SCHOUNTZ, T. 2014. Immunology of Bats and Their Viruses: Challenges and Opportunities. *Viruses*, 6, 4880-4901.

SHI, Z. 2010. Bat and virus. *Protein Cell*, 1, 109-14.

SIKES, R. S. & GANNON, W. L. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92, 235-253.

SIMMONS, C. P., WOLBERS, M., NGUYEN, M. N., WHITEHORN, J., SHI, P. Y., YOUNG, P., PETRIC, R., NGUYEN, V. V., FARRAR, J. & WILLS, B. 2012. Therapeutics for dengue: recommendations for design and conduct of early-phase clinical trials. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1752.

SOTOMAYOR-BONILLA, J., CHAVES, A., RICO-CHAVEZ, O., ROSTAL, M. K., OJEDA-FLORES, R., SALAS-ROJAS, M., AGUILAR-SETIEN, A., IBANEZ-BERNAL, S., BARBACHANO-GUERRERO, A., GUTIERREZ-ESPELETA, G., AGUILAR-FAISAL, J. L., AGUIRRE, A. A., DASZAK, P. & SUZAN, G. 2014. Dengue Virus in Bats from Southeastern Mexico. *Am J Trop Med Hyg*.

SURASOMBATPATTANA, P., EKCHARIYAWAT, P., HAMEL, R., PATRAMOOL, S., THONGRUNGIAT, S., DENIZOT, M., DELAUNAY, P., THOMAS, F., LUPLERTLOP, N. & YSSEL, H. 2013. *Aedes aegypti* saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*.

THOMPSON, N., AUGUSTE, A., TRAVASSOS DA ROSA, A., CARRINGTON, C., BLITVICH, B., CHADEE, D., TESH, R., WEAVER, S. & ADESIYUN, A. 2015. Seroepidemiology of selected alphaviruses and flaviviruses in bats in Trinidad. *Zoonoses and public health*, 62, 53-60.

VAN DEN HURK, A. F., SMITH, C. S., FIELD, H. E., SMITH, I. L., NORTHILL, J. A., TAYLOR, C. T., JANSEN, C. C., SMITH, G. A. & MACKENZIE, J. S. 2009. Transmission of Japanese Encephalitis virus from the black flying fox, *Pteropus alecto*, to *Culex annulirostris* mosquitoes, despite the absence of detectable viremia. *Am J Trop Med Hyg*, 81, 457-62.

VASILAKIS, N., CARDOSA, J., HANLEY, K. A., HOLMES, E. C. & WEAVER, S. C. 2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*, 9, 532-41.

VASILAKIS, N., TESH, R. B. & WEAVER, S. C. 2008. Sylvatic dengue virus type 2 activity in humans, Nigeria, 1966. *Emerging infectious diseases*, 14, 502.

VAUGHAN, K., GREENBAUM, J., BLYTHE, M., PETERS, B. & SETTE, A. 2010. Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. *Viral immunology*, 23, 259-284.

VELANDIA, M. L. & CASTELLANOS, J. E. 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15, 33-43.

VOGE, N. V., SANCHEZ-VARGAS, I., BLAIR, C. D., EISEN, L. & BEATY, B. J. 2013. Detection of dengue virus NS1 antigen in infected *Aedes aegypti* using a commercially available kit. *Am J Trop Med Hyg*, 88, 260-6.

WANG, E., NI, H., XU, R., BARRETT, A. D., WATOWICH, S. J., GUBLER, D. J. & WEAVER, S. C. 2000. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*, 74, 3227-34.

WATANABE, S., OMATSU, T., MIRANDA, M. E., MASANGKAY, J. S., UEDA, N., ENDO, M., KATO, K., TOHYA, Y., YOSHIKAWA, Y. & AKASHI, H. 2010. Epizootology and

experimental infection of Yokose virus in bats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 25-36.

WEAVER, S. C. & VASILAKIS, N. 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*, 9, 523-40.

WHITEHORN, J. & SIMMONS, C. P. 2011. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*, 29, 7221-8.

WU, Z., REN, X., YANG, L., HU, Y., YANG, J., HE, G., ZHANG, J., DONG, J., SUN, L., DU, J., LIU, L., XUE, Y., WANG, J., YANG, F., ZHANG, S. & JIN, Q. 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol*, 86, 10999-1012.

YOUNG, P. R., HILDITCH, P. A., BLECHLY, C. & HALLORAN, W. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*, 38, 1053-7.

ZOMPI, S. & HARRIS, E. 2012. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*, 4, 62-82.