



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

**Detección molecular de patógenos transmitidos por artrópodos en  
*Desmodus rotundus* de México**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable**

PRESENTA

MVZ Edgar Hurtado Mendoza

DIRIGIDO POR

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

CODIRIGIDO POR

Dra. Rosa Victoria Pando Robles

Querétaro, Qro., Octubre de 2025

**La presente obra está bajo la licencia:**  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



## CC BY-NC-ND 4.0 DEED

### Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

#### **Usted es libre de:**

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

#### **Bajo los siguientes términos:**

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

#### **Avisos:**

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

**Detección molecular de patógenos transmitidos por artrópodos en  
*Desmodus rotundus* de México.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable**

PRESENTA:

MVZ Edgar Hurtado Mendoza

DIRIGIDO POR:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

CODIRIGIDO POR:

Dra. Rosa Victoria Pando Robles

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dra. Rosa Victoria Pando Robles

Secretario

Dra. Consuelo Almazán García

Vocal

Dr. Álvaro Aguilar Setién

Suplente

Dr. Diego Josimar Hernández Silva

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Octubre, 2025

México

## Resumen

El presente estudio se enfocó en la detección molecular, mediante técnicas de PCR y RT-PCR, de material genético de organismos del orden Piroplasmida, el género *Rickettsia*, así como de los 4 serotipos del virus del dengue (DENV) en sangre, bazo e hígado del murciélagos vampiro común, *Desmodus rotundus*. Se capturaron 32 ejemplares en los estados de Querétaro, Hidalgo y Tabasco. Para la detección del gen *18S rRNA* se implementaron 3 protocolos: PCR punto final, PCR semianidada y PCR anidada; de ellos, 14 muestras sanguíneas amplificaron fragmentos del tamaño esperado, aunque ninguna de las secuencias obtenidas resultó positiva para organismo del orden Piroplasmida. Tampoco se detectó la presencia de la proteína OmpB del género *Rickettsia* en ninguna muestras de bazo analizadas (0%). En contraste, 17 muestras hepáticas (53.12%) resultaron positivas para DENV-3, correspondientes a 13 ejemplares provenientes de Hidalgo (40.62%) y 4 de Tabasco (12.5%). Este es el primer estudio que reporta la presencia de DENV-3 en muestras biológicas de *D. rotundus*. La detección de estos agentes constituye una aproximación al estudio de *D. rotundus* como potencial reservorio de patógenos zoonóticos, y contribuye a la comprensión de la epidemiología y dinámicas de las enfermedades arbovirales.

**Palabras Clave:** Babesiosis, rickettsiosis, Dengue, zoonosis, *Desmodus*.

## Abstract.

This study is focused on the molecular detection of genetic material from organisms of the order Piroplasmida, the genus *Rickettsia*, and the four Dengue virus (DENV) serotypes in blood, spleen, and liver samples from the common vampire bat, *Desmodus rotundus*, using PCR and RT-PCR amplification techniques. Thirty-two specimens were captured in Queretaro, Hidalgo, and Tabasco. Three protocols for the detection of the *18S rRNA* gene were performed: endpoint PCR, semi-nested PCR, and nested PCR. Fourteen blood samples amplified a fragment of the expected size; however, none of the sequenced samples showed positive results for any piroplasmid. No specimens tested positive for the OmpB protein of the genus *Rickettsia* in spleen samples (0%). Seventeen liver samples (53.12%), thirteen specimens from Hidalgo (40.62%) and 4 from Tabasco (12.5%) tested positive for a fragment of prM protein of DENV-3. This study is the first to report the presence of DENV-3 in biological samples of *Desmodus rotundus*. The detection of these agents is an approach to the study of *Desmodus rotundus* as a potential reservoir of zoonotic pathogens, which contributes to the understanding of the epidemiology and dynamics of arboviral diseases.

**Keywords:** Babesiosis, rickettsiosis, dengue, zoonosis, *Desmodus*.

## Agradecimientos.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

A la Facultad de Ciencias Naturales (FCN).

A la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable (MSPAS).

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por su guía, atenciones y todo el conocimiento compartido desde hace años. También por dejarme ser parte de su equipo de investigación y permitirme trabajar en su laboratorio. Quisiera agradecerle por su confianza en mí y en el proyecto.

A la Doctora Victoria Pando Robles por su guía y apoyo en el laboratorio de virología; por todo el conocimiento compartido, y por todas sus atenciones durante mi estancia en el Instituto Nacional de Salud Pública. De igual manera quisiera agradecerle por el interés y entusiasmo mostrado en el proyecto. Muchas gracias por todo Doc.

Al Dr. Álvaro Aguilar Setién, por darse el tiempo de asesorarme en el proyecto, por compartirme sus conocimientos tanto en campo como en laboratorio. También quisiera agradecerle por considerarme para formar parte de Kanan, así como por todas sus atenciones brindadas durante mis visitas al estado de Morelos.

Al Dr. Diego Josimar Hernández Silva por tu paciencia, guía y sobre todo por todo el gran apoyo brindado para la realización del trabajo de laboratorio, fundamental para llevar a cabo el trabajo experimental. De igual manera quisiera agradecerte por todo el conocimiento compartido en la asignatura de biología molecular.

A la Dra. Consuelo Almazán García por su apoyo para el análisis de los extendidos de sangre para la identificación de posibles hemoparásitos. Así mismo agradecerle por el interés y entusiasmo mostrado en el proyecto, así como por el conocimiento y las ideas compartidas durante sus clases teóricas y prácticas sobre identificación y trabajo de garrapatas en la investigación.

A la Dra. Nidia Aréchiga Ceballos por todo el apoyo brindado para el proyecto, por su apoyo para coordinar las salidas de campo, por su apoyo durante la captura en Progreso de Obregón y por todo el conocimiento compartido.

Al Dr. Ignacio Olave Leyva por el apoyo durante la captura realizada en Progreso de Obregón, Hidalgo. Por el apoyo brindado para el procesamiento de la muestras en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), así como por todas las facilidades y atenciones recibidas durante mi estancia en Hidalgo.

A la M.C. Cenia Almazán Marín, por todo el conocimiento, los momentos divertidos, las ideas que has compartido conmigo, y sobre todo por tu gran amistad.

A la Biol. Mariana Acuña Ruiz por su apoyo durante el viaje y las capturas realizadas en Tabasco.

A la Dra. Fabiola Garcés Ayala por su apoyo durante la colecta y el procesamiento de las muestras en la captura realizada en Progreso de Obregón.

Al MVZ Christian Olaf Olave Galindo Por su apoyo durante la colecta y procesamiento de las muestras durante la captura realizada en Progreso de Obregón.

A la MVZ Guadalupe Ramírez Muñoz por su apoyo y capacitación para la toma de muestras sanguíneas, durante el procesamiento de estas en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

A todos los miembros de Kanan por todo el conocimiento y las experiencias en campo que he tenido la oportunidad de compartir con Ustedes. Son un gran equipo y los estimo mucho a todos.

Al Dr. Edgar Quezada Ruíz y a la eIBT María Xiomara Escalona Osorio por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI).

Al Dr. Víctor Bermúdez por todo el apoyo, el conocimiento, la paciencia y la disposición brindados durante mi estancia en el Instituto Nacional de Salud Pública. Muchas gracias, Víctor.

A Luis Castillo Pérez por tu amistad y todo el apoyo brindado durante el proyecto.

A la Dra. Xochitl García López, por todo el apoyo y las atenciones recibidas durante la captura realizada en Jalpan de Serra, Querétaro.

Al Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado, S.C. por las facilidades para realización de la captura realizada en Jalpan de Serra, Querétaro.

Al Dr. Rafael Ávila Flores y a su equipo de investigación de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por todo el apoyo, el conocimiento y las atenciones brindadas durante mi paso por Poaná.

Al M. en C. Rafael León Madrazo, por todo el apoyo y atenciones brindadas durante las salidas de campo en Poaná.

## Dedicatoria

A las dos personas más importantes en mi vida, quienes me han apoyado en absolutamente todo. Las dos personas que me han enseñado el significado del amor verdadero, y cómo este habita en todas las cosas, aun en las más pequeñitas y casi imperceptibles, mis papás, María Luisa Mendoza Correa y Alfonso Miguel Ángel Hurtado Piñón.

A mi tía Ma. Isabel Mendoza Correa, definitivamente sin tu apoyo y ejemplo nunca habría llegado hasta acá.

A todos mis abuelos, sé que estarían muy contentos.

## Índice

Resumen.....	III
Abstract.....	IV
Agradecimientos.....	V
Dedicatoria.....	VIII
Índice.....	IX
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Cuadros.....	XIII
I. Introducción .....	14
II. Antecedentes.....	15
2.1 Orden Chiroptera.....	15
2.2 Quirópteros en México.....	17
2.3. <i>Desmodus rotundus</i> .....	17
2.4. Los quirópteros como posibles reservorios de patógenos zoonóticos y enfermedades vectoriales. .....	25
2.5 <i>Rickettsia</i> spp. .....	28
2.5.1. Rickettsias detectadas en quirópteros.....	29
2.6. Piroplasmida.....	32
2.6.1. Piroplásmidos detectados en quirópteros .....	32
2.7. <i>Orthoflavivirus</i> .....	35
2.7.1 Proteínas estructurales .....	40
2.7.2. Proteínas no estructurales.....	42
2.7.3. <i>Orthoflavivirus</i> en quirópteros .....	44
2.8. Virus Dengue (DENV) .....	50
2.8.1. Agente etiológico.....	53
2.8.2. Proteínas estructurales.....	55
2.8.3. Proteínas no estructurales.....	56
2.8.4. Ciclo biológico de DENV .....	59
2.8.5. Signos y síntomas.....	62
2.8.6. Epidemiología .....	64
2.8.7. Tratamientos y vacunas.....	68
2.8.8. Diagnóstico.....	68
2.8.9. DENV en animales.....	69
2.8.10. DENV en quirópteros.....	78

III. Justificación.....	86
IV. Hipótesis.....	87
V. Objetivos .....	87
5.1. Objetivo General .....	87
5.2 Objetivos Específicos.....	87
VI. Materiales y métodos .....	88
6.1 Captura de especímenes .....	88
6.2 Toma de muestras.....	90
6.2.1 Obtención de muestras de sanguíneas.....	90
6.2.2 Toma de muestras de tejidos.....	90
	91
6.3. Extracción de ADN y ARN de muestras de sangre y órganos.....	92
6.3.1 Extracción de ADN a partir de muestras de sangre.....	92
6.3.2. Extracción de ADN a partir de muestras de Bazo.....	92
6.3.3. Extracción de ARN a partir de muestras de Hígado.....	93
6.4. Retrotranscripción .....	94
6.5. Detección de material genético .....	95
6.5.1. RT-PCR para la amplificación de <i>gapdh</i> .....	95
6.5.2. PCR punto final, semianidado y anidado para la detección de Piroplásmidos.....	96
6.5.3. RT-PCR para la detección de <i>Rickettsia</i> spp. ....	100
6.5.4. RT-PCR para la detección de DENV.....	102
VII. Resultados .....	103
7.1. Captura de especímenes .....	103
7.2. Control de extracción de ácidos nucleicos. ....	105
7.3. Detección de Piroplásmidos. ....	107
7.4. Detección de <i>Rickettsia</i> spp.....	110
7.5. Detección de DENV .....	110
VIII.Discusión.....	113
IX. Conclusiones .....	125
X. Referencias.....	126

## Índice de Figuras.

<b>Figura 1.</b> Fotografía de un ejemplar de sedado de <i>D. rotundus</i> capturado en Progreso de Obregón.	20
<b>Figura 2.</b> Ejemplar de <i>D. rotundus</i> capturado en Jalpan de Serra. ....	22
<b>Figura 3.</b> Acercamiento al rostro de <i>D. rotundus</i> , donde pueden apreciarse sus características morfológicas faciales propias de la especie. ....	23
<b>Figura 4.</b> Esquema general de los viriones de la familia Flaviviridae (Ilustración modificada de ViralZone). ....	39
<b>Figura 5.</b> Esquema de la organización del genoma de los virus del género <i>Orthoflavivirus</i> (Ilustración modificada de ViralZone). ....	40
<b>Figura 6.</b> Mapa de distribución de murciélagos con evidencia de la presencia de agentes virales zoonóticos. (Tomado de Liu <i>et al.</i> , 2024).....	44
<b>Figura 7.</b> Virión maduro de DENV y localización en el genoma de las proteínas estructurales y no estructurales.....	54
<b>Figura 8.</b> Mapa de grupos taxonómicos en los cuales se ha detectado evidencia molecular y serológica de DENV .....	70
<b>Figura 9.</b> Esquema de algunos grupos taxonómicos en los cuales ha sido detectada evidencia serológica (izquierda) y molecular (derecha).....	78
<b>Figura 10.</b> Serotipos de DENV detectados en quirópteros mexicanos mediante técnicas serológicas y moleculares. ....	81
<b>Figura 11.</b> Mapa de los sitios de captura y muestreo de los ejemplares de <i>D. rotundus</i> . ....	89
<b>Figura 12.</b> Esquema de las técnicas empleadas para la detección de los agentes evaluados. ....	91
<b>Figura 13.</b> Ejemplares de <i>D. rotundus</i> capturados mediante redes de niebla en Jalpan de Serra... 104	104
<b>Figura 14.</b> Punción de la vena braquial para la obtención de sangre mediante tubos capilares para la realización de frotis. ....	104
<b>Figura 15.</b> Necropsia de ejemplares de <i>D. rotundus</i> capturados en Hidalgo (izquierda) y Tabasco (derecha).....	105
<b>Figura 16.</b> Ejemplo de la electroforesis en agarosa al 1% para corroborar la integridad del ADN extraído de sangre, mostrando un patrón electroforético....	105
<b>Figura 17.</b> Ejemplo del gel de agarosa al 1% realizado para corroborar la integridad del ADN extraído de bazo. ....	106
<b>Figura 18.</b> Ejemplo de los resultados de RT-PCR para control del gen endógeno <i>gapdh</i> de muestras de bazo. ....	106

<b>Figura 19.</b> Ejemplo de los resultados de RT-PCR para control del gen endógeno gapdh en muestras de hígado.....	107
<b>Figura 20.</b> Ejemplo de la amplificación del gen 18S rRNA de Piroplasmida, obteniendo un amplicón esperado de aproximadamente 425 pb (Casati <i>et al.</i> , 2006). <b>MTM</b> = marcador de talla molecular (1Kb). <b>C+=</b> control positivo. <b>C-=</b> control negativo. <b>M1-7=</b> muestras.....	107
<b>Figura 21.</b> Amplificación del gen 18S rRNA de Piroplasmida, obteniendo un amplicón esperado de aproximadamente 800 pb (Mongruel <i>et al.</i> , 2022). <b>MTM</b> = marcador de talla molecular (1Kb). <b>C+=</b> control positivo. <b>C-=</b> control negativo. <b>M1-5=</b> Muestras.....	108
<b>Figura 22.</b> Amplificación del gen 18S rRNA de Piroplasmida, obteniendo un amplicón esperado de 460-520 pb (Gubbels <i>et al.</i> , 1999). <b>MTM</b> = marcador de talla molecular (1Kb). <b>C+=</b> control positivo. <b>C-=</b> control negativo. <b>M1-10=</b> muestras.....	109
<b>Figura 23.</b> Ejemplo del electroferograma obtenido por medio de secuenciación capilar de una de las muestras positivas para los tres protocolos usados para la detección de piroplásmidos .....	109
<b>Figura 24.</b> Ejemplo de reacción para la detección de <i>Rickettsia</i> spp. Se obtuvieron resultados negativos para la amplificación del gen codificante para la proteína OmpB. Se observan curvas de distintos colores indicando la amplificación esperada de los controles.....	110
<b>Figura 25.</b> Ejemplo de muestras de hígado positivas al protocolo de RT-PCR empleado para la detección de DENV-3.....	111

## Índice de Cuadros.

<b>Cuadro 1.</b> Taxonomía de <i>Desmodus rotundus</i> (Simmons & Cinarello, 2025).....	19
<b>Cuadro 2.</b> Características de los 4 géneros de la familia Flaviviridae .....	36
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación taxonómica actual de la familia Flaviviridae (ICTV, 2025; Simmonds <i>et al.</i> ,2023). ....	37
<b>Cuadro 4.</b> Distribución de <i>Orthoflavivirus</i> detectados en diversas especies de murciélagos. (Rajalopagan <i>et al</i> , 1960; Allen <i>et al.</i> , 1970; Kading & Schountz, 2016; Blitvich & Firt., 2017; Fagre & Kading, 2019; Gwee <i>et al.</i> , 2021; Bonilla-Aldana <i>et al.</i> , 2024).....	46
<b>Cuadro 5.</b> Resumen del cuadro clínico generado por la infección de DENV durante cada una de las 4 fases (OPS, 2024; SINAVE, 2024).....	63
<b>Cuadro 6.</b> Iniciadores usados para la detección del gen endógeno <i>gapdh</i> en muestras de bazo e hígado.....	95
<b>Cuadro 7.</b> Condiciones de termociclado para la RT-PCR para la detección del gen <i>gapdh</i> (Meshram <i>et al.</i> , 2024). .....	96
<b>Cuadro 8.</b> Iniciadores usados para la detección de piroplásmidos.....	97
<b>Cuadro 9.</b> Condiciones de termociclado para el PCR punto final (Casati <i>et al.</i> , 2006). .....	98
<b>Cuadro 10.</b> Condiciones de termociclado para el PCR semianidado (Gubbels <i>et al.</i> , 1999). .....	99
<b>Cuadro 11.</b> Condiciones de termociclado para el PCR anidado (Mongruel <i>et al.</i> , 2022). .....	100
<b>Cuadro 12.</b> Iniciadores utilizados para la detección de <i>Rickettsia</i> spp. mediante qPCR SYBR Green (Blanda <i>et al.</i> , 2020).....	101
<b>Cuadro 13.</b> Condiciones de termociclado para la RT-PCR (Blanda <i>et al.</i> , 2020). .....	101
<b>Cuadro 15 .</b> Condiciones de termociclado para el RT-PCR para la detección de DENV-1, DENV.2 DENV.2 y DENV-4 con el protocolo propuesto por Santiago <i>et al.</i> , 2013, que amplifica un fragmento de los genes codificantes para las proteínas NS5, E y prM de DENV.....	103
<b>Cuadro 16.</b> Lista de ejemplares capturados y resultados de los análisis moleculares.....	113

## I. Introducción

El orden *Chiroptera* comprende un grupo de mamíferos con características únicas: son los únicos mamíferos capaces de realizar un vuelo verdadero, representan el segundo orden más diverso después orden *Rodentia* con más de 1400 especies. Los murciélagos exhiben una esperanza de vida notablemente alta en comparación con mamíferos de talla similar. Ciertas especies son migratorias y recorren distancias considerables, mientras que otras entran en estado de hibernación durante una parte del año. Además, proporcionan importantes servicios ecosistémicos como la polinización, la dispersión de semillas y el control de artrópodos que actúan como vectores de agentes patógenos.

Una de las características más estudiadas de los quirópteros, es su capacidad para albergar una amplia gama de agentes virales, bacterianos y parásitos. Muchos de los cuales están estrechamente relacionados con patógenos de importancia para la salud pública y veterinaria; sin embargo, es importante señalar que su papel como hospederos y reservorios sigue siendo investigado a detalle para comprender las dinámicas de estos patógenos.

Entre los grupos de patógenos más importantes para la salud pública están los agentes transmitidos por vectores, cuya presencia ha sido detectada en murciélagos y sus ectoparásitos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades transmitidas por vectores representan el 17% de las enfermedades infecciosas y causan aproximadamente 700 mil muertes anuales.

La aparición de ciclos de transmisión urbanos para estas enfermedades se relaciona con modificaciones antropogénicas como el cambio climático, el cambio de uso de suelo, la minería, la deforestación y la ganadería. Estas actividades facilitan la presencia de vectores hematófagos que pueden alimentarse tanto de fauna silvestre, animales domésticos y humanos, los cuales a su vez pueden actuar como hospederos amplificadores.

*Desmodus rotundus* es una de las tres especies existentes de murciélagos hematófagos y la única especie de su género. Mas allá de su papel establecido como reservorio y vector del virus de la rabia, su importancia se ve acentuada por su proximidad al ganado, del cual se alimenta. Esta proximidad incrementa la probabilidad de contacto con humanos y, en

consecuencia, el potencial de transmisión bidireccional de agentes infecciosos. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo detectar patógenos transmitidos por artrópodos en muestras de sangre y órganos de ejemplares de *D. rotundus*. Esta investigación contribuirá a la comprensión de la epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores, lo que podría fundamentar el desarrollo de estrategias de control y prevención de enfermedades con potencial zoonótico.

## II. Antecedentes.

### 2.1 Orden Chiroptera.

El orden Chiroptera es el único grupo taxonómico de mamíferos dotado de la capacidad de vuelo verdadero. Esta característica les confiere una amplia distribución geográfica, hábitos migratorios, y el potencial, para dispersar patógenos a grandes distancias (Messenger *et al.*, 2002). Se trata de un taxón sumamente diverso clasificado actualmente en 21 familias, 232 géneros y 1,487 especies (Simmons & Cirranello, 2025). Representa el segundo orden más numeroso de mamíferos después del orden Rodentia, y representa más del 20% de todas las especies de mamíferos existentes (Taylor, 2019; Mammalian Diversity Database, 2024).

Entre sus características particulares de este grupo taxonómico, destaca una longevidad excepcional, con una esperanza de vida entre tres a diez veces mayor, que la de otros mamíferos de talla similar, (Taylor, 2019; Cooper *et al.*, 2024). Otra adaptación notable es la ecolocalización laríngea, una habilidad utilizada para navegar y depredar en entornos nocturnos o de oscuridad total mediante la interpretación de ecos. Aunque esta característica está presente en los microquirópteros, está ausente en la mayoría de los macroquirópteros. Cabe señalar que la ecolocalización también ha evolucionado de manera independiente en unos pocos miembros de los órdenes Cetartiodactyla, Afrosoricida, Eulypotiphla y Rodentia (Taylor, 2019; He *et al.*, 2021).

Los quirópteros presentan una distribución cosmopolita exceptuando los círculos polares y algunas islas oceánicas. La mayor proporción de las especies se concentran en las regiones tropicales y subtropicales, aunque algunas habitan regiones templadas. Generalmente presentan hábitos gregarios formando colonias de tamaño variable dependiendo de la especie (Scheffer *et al.*, 2022).

Tradicionalmente los quirópteros se han dividido en dos subórdenes basados en características morfológicas: Microchiroptera formado por la mayoría de los murciélagos pequeños con capacidad de ecolocalización y compuesto por 17 familias; y Megachiroptera formado por murciélagos de gran tamaño que no presentan ecolocalización, a excepción del murciélagos egipcio de la fruta, *Rousettus aegyptiacus*. Sin embargo, actualmente se propone una clasificación basada en criterios genéticos moleculares, que sugiere dividir a los quirópteros en dos subórdenes:

- Pteropodiformes (Yinpteroquiroptera) que incluye a las familias: Pteropodidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Megadermatidae, Craseonycteridae Rhinonycteridae, y Rhinopomatidae;
- Vespertilioniformes (Yangochiroptera) que incluye 14 familias: Cistugidae, Emballonuridae, Furipteridae, Miniopteridae, Molossidae, Mormoopidae, Mystacinidae, Myzopodidae, Natalidae, Noctilionidae, Nycteridae, Phyllostomidae, Thyropteridae y Vespertillionidae (Taylor, 2019; Simmons & Cinarrello, 2024).

Como resultado de su adaptación a una gran diversidad de nichos ecológicos, los murciélagos también se clasifican con base en su dieta, en diferentes gremios tróficos: insectívoros, frugívoros, nectarívoros, ictiófagos, carnívoros y hematófagos. Mientras que algunas especies son especialistas estrictos otras son generalistas (polífagos), mostrando flexibilidad en su alimentación (Villa, 1976).

## 2.2 Quirópteros en México.

En México el orden Chiroptera constituye el segundo grupo de mamíferos con mayor abundancia y diversidad (Aguilar Setien *et al.*, 2008). El país alberga poco más de 140 especies (Cordero *et al.*, 2014; Ramírez-Pulido *et al.*, 2014) distribuidas en 8 familias, de las cuales aproximadamente 20 son endémicas (cerca del 13%) (Sil-Berra *et al.*, 2024). Recientemente se describieron dos nuevas especies endémicas: *Corynorhinus paniaguae* (López-Cuamatzi *et al.*, 2024) y *Vampyressa villai* (Garbino *et al.*, 2024). Asimismo, en la primera mitad de 2025, fue reportada por primera vez la presencia de la especie *Phyllostomus hastatus* en territorio mexicano (Aranda-Coello *et al.*, 2025).

La NORMA Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) incluye un listado de 38 especies de quirópteros con algún estatus de riesgo para su conservación en México. Estas especies pertenecientes a 7 familias incluyen 6 endémicas y 32 no endémicas. De acuerdo con esta normativa 17 especies se encuentran sujetas a protección especial, 17 están categorizadas como amenazadas y 4 se encuentran en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT-2010).

## 2.3. *Desmodus rotundus*

De las 1487 especies de murciélagos conocidas actualmente, únicamente 3 poseen una dieta hematófaga estricta, además de ser los únicos mamíferos con este hábito alimenticio (Ramí, *et al.*, 2024; Simmons & Cinarrello, 2025).

Estas tres especies que conforman la subfamilia Desmodontinae (Phyllostomidae) son: *Diphylla eucaudata* (murciélagos vampiro de patas peludas), *Diaemus youngi* (murciélagos vampiro de alas blancas) ambos con una dieta altamente especializada en sangre de aves; y *Desmodus rotundus* (murciélagos vampiro común). *D. rotundus* presenta una dieta menos estricta, alimentándose de la sangre de una amplia variedad de presas (Villa, 1976; Greenhall *et al.*, 1983; Torres-Mejía *et al.*, 2021). Su espectro trófico incluye cerca de 63 especies de 45 familias, pertenecientes a 21 órdenes y 4 clases de vertebrados: mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Brown & Escobar, 2023). Entre sus presas predominan los animales

domésticos como bovinos, equinos y suidos, y en mucho menor medida pueden alimentarse del ser humano (Aguilar-Setien *et al.*, 1998, Scheffer *et al.*, 2022).

*D. rotundus* posee una gran plasticidad trófica, originada por los cambios en la disponibilidad de presas en su entorno. La proliferación y abundancia de producciones pecuarias en el neotrópico junto con su mayor accesibilidad en comparación con la fauna silvestre han convertido al ganado en sus presas preferidas (Gonçalves *et al.*, 202). Este hecho es fundamental para entender su papel central en la epidemiología de la rabia paralítica bovina (Aguilar-Setien *et al.*, 1998, Scheffer *et al.*, 2022).

Además de su papel como vector del virus rábico, los efectos directos de *D. rotundus*, radican también en las lesiones generadas por su mordedura, estas heridas predisponen a la aparición de infecciones bacterianas secundarias y miasis, lo que genera depreciación del valor de las pieles. Además, la capacidad de provocar estados de anemia en el ganado resultando en una disminución de la energía metabólica que se refleja en la reducción de los parámetros productivos (Villa, 1976; Flores-Crespo, 1992; Torres-Mejía *et al.*, 2021).

Los registros fósiles del género *Desmodus*, han sido hallados exclusivamente en el continente americano y datan del Pleistoceno. Se han descrito 4 especies, 3 de ellas extintas: *D. archaeodaptes*, *D. stocki* y *D. draculae*, y *D. rotundus*; la única especie existente en la actualidad (Greenhall *et al.*, 1983; Trajano & Vivo, 1991). Algunos autores dividen a *D. rotundus* en dos subespecies según su distribución geográfica: *D. rotundus rotundus* en Sudamérica y *D. rotundus murinus* en Mesoamérica (Villa, 1976). Además, restos encontrados en Cuba han sido objeto de debate, ya que algunos autores le consideran una especie distinta a *D. rotundus* y otros una de subespecie de esta, denominándole *D. rotundus puntajudensis* (Orihuela, 2011).

**Cuadro 1.** Taxonomía de *Desmodus rotundus* (Simmons & Cinarello, 2025).

<b>Reino</b>	<b>Animalia</b>
<b>Phylum</b>	Chordata
<b>Clase</b>	Mammalia
<b>Orden</b>	Chiroptera
<b>Familia</b>	Phyllostomidae
<b>Subfamilia</b>	Desmodontinae
<b>Género</b>	<i>Desmodus</i>
<b>Especie</b>	<i>Desmodus rotundus</i>
<b>Subespecies</b>	<i>Desmodus rotundus murinus</i> <i>Desmodus rotundus rotundus</i>

El murciélagos hematófago *D. rotundus*, es la especie de murciélagos hematófago más abundante en Centro y Sudamérica; con una distribución que se extiende desde el noreste de México (paralelo 27° latitud norte) hasta el norte de Argentina y Chile (paralelo 33° latitud sur abarcando 24 estados de la República Mexicana. Su distribución está asociada a condiciones ambientales específicas, con una humedad relativa cercana al 45%, y del 70 al 100% en el interior de los refugios; y una temperatura fluctuante entre los 20°C a los 27°C. Cabe destacar que la especie es poco tolerante a modificaciones drásticas de estos parámetros (Villa, 1976; Greenhall *et al.*, 1983; Zarza *et al.*, 2017). La especie es capaz de habitar hasta los 3500 msnm en una gran diversidad de hábitats, desde zonas áridas hasta bosques tropicales (Brown & Escobar, 2023).

Las modificaciones antropogénicas en Centro y Sur América como la fragmentación de los hábitats, el cambio de uso de suelo para actividades agropecuarias, la deforestación, y los fenómenos han alterado el comportamiento, la distribución y la dispersión de *D. rotundus* desde la llegada de los europeos hasta la actualidad (Goodwin *et al.*, 1961; Villa, 1976; Brown & Escobar, 2023).

*D. rotundus*, tiene la capacidad de habitar una amplia variedad de refugios como lo son cuevas, túneles, huecos en los árboles, grietas en las rocas, paredes, puentes y construcciones abandonadas. Poseen hábitos gregarios y sus colonias pueden oscilar entre unos cuantos individuos hasta algunos cientos; sin embargo, existen reportes de investigadores mexicanos en los cuales se han encontrado miles de individuos compartiendo refugio con otras especies (Goodwin *et al.*, 1961; Villa, 1976; Flores-Crespo, 1992; Ávila-Vargas *et al.*, 2024).

Una característica propia de *D. rotundus* es su postura en reposo. A diferencia de la mayoría de los murciélagos que se suspenden cabeza abajo utilizando sus miembros pelvianos, esta especie se posa sobre superficies apoyándose en sus miembros posteriores y en las garras de los pulgares de sus alas (miembros anteriores). Su nicho en el interior del refugio permanece bien delimitado por encima del depósito de heces semilíquidas sanguinolentas (Flores-Crespo, 1992).

Morfológicamente, *D. rotundus* cuenta con un pelaje corto de densidad moderada y textura suave, con coloración parduzca en la región dorsal y gris claro en la región ventral; sin embargo, dependiendo de la zona geográfica en que habite pueden existir algunas otras variantes cromáticas (Scheffer *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Fotografía de un ejemplar de sedado de *D. rotundus* capturado en Progreso de Obregón.

Otra adaptación importante, es la presencia de un fuerte pulgar altamente desarrollado, mismo que posee tres almohadillas en su porción ventral. Este les permite una excelente locomoción terrestre plegando sus alas y usando sus miembros anteriores para la locomoción cuadrúpeda y así realizar hábiles saltos y emprender el vuelo a partir del impulso realizado por estos (Scheffer *et al.*, 2019). Los miembros posteriores están parcialmente cubiertos por pelo, posee un calcáneo rudimentario, carecen de cola y el uropatagio es angosto, apenas perceptible (Goodwin *et al.*, 1961; Greenhall *et al.*, 1983).

El tamaño corporal promedio oscila entre los 69 a 90 mm de longitud, con un antebrazo es de 52 a 63 mm y la envergadura de sus alas de entre 30 a 40 cm y un peso de entre 25 a 40 g. Sus ojos son de menor tamaño comparado con las otras dos especies de vampiros. Tiene orejas pequeñas y redondeadas. El labio inferior presenta forma de V con un surco intermedio que permite el flujo de sangre por capilaridad hacia el interior de la cavidad oral durante la alimentación (Villa, 1976; Scheffer *et al.*, 2019), además de la presencia de surcos en la cara ventral de la lengua con funciones similares (Neuweiler, 2000).

Poseen incisivos superiores bien desarrollados con su extremo distal en forma de cincel, posicionados entre los caninos puntiagudos, las cúspides de los incisivos quedan posicionados detrás de los incisivos inferiores. Los premolares son estrechos con bordes afilados (Villa, 1976) y los molares están ausentes o son rudimentarios como resultado de su dieta estrictamente líquida (Villa, 1976; Rami *et al.*, 2024). Los incisivos inferiores son pequeños y poseen un borde afilado que presenta tres lóbulos; se disponen en pares formando un espacio en la región media de la mandíbula, el cual se corresponde con la escotadura labial característica de la especie. Los caninos que son de tamaño regular funcionan como pinzas en lugar de ser utilizados para desgarrar (Villa, 1966). Su fórmula dentaria es: 1/2, 1/1, 1/2, 1/1= 20, teniendo la menor cantidad de piezas dentales entre los quirópteros (Goodwin *et al.*, 1961; Greenhall *et al.*, 1983; Neuweiler, 2000).

*D. rotundus* se alimenta tras aterrizar cerca de su presa o directamente sobre ella, y utiliza su locomoción terrestre especializada, corriendo y saltando, para aproximarse. Una vez lo suficientemente cerca, utiliza los termorreceptores de su rostro para localizar zonas densamente vascularizadas como el cuello, la corona de las pezuñas, el borde de las orejas, las ubres, la región perianal y los dedos de los pies en humanos (Neuweiler, 2000; Rami *et*

*al., 2024). Posteriormente procede a humedecer la zona con su saliva, presiona su mandíbula contra la piel fungiendo como apoyo para cerrar rápidamente el maxilar y arrancar un pedazo de piel (Neuweiler, 2000). Generalmente la lesión producida por la mordedura se presenta como una solución de continuidad con forma semicircular o elíptica, producida por los incisivos superiores, misma que es prácticamente indolora (Goodwin *et al.*, 1961).*



**Figura 2.** Ejemplar de *D. rotundus* capturado en Jalpan de Serra.

Debido a los compuestos anticoagulantes y activadores de plasminógeno presentes en su saliva, además de la constante laceración del tejido por la acción de su lengua altamente queratinizada, la herida sangra profusamente durante la alimentación y durante un periodo prolongado. *D. rotundus* aproxima la hendidura del labio inferior a la herida y, debido a los movimientos continuos de la lengua del interior al exterior, los canalículos de su región ventral generan un efecto de bombeo que conduce la sangre hacia la cavidad oral al extenderse y contraerse (Neuweiler, 2000).



**Figura 3.** Acercamiento al rostro de *D. rotundus*, donde pueden apreciarse sus características morfológicas faciales propias de la especie.

Cada sesión de alimentación tiene una duración aproximada de 25 minutos con varias pausas y pueden ingerir hasta 15 g, (equivalente a lo que representa cerca de la mitad del promedio del peso de un ejemplar adulto y en algunos casos hasta dos tercios). El tubo digestivo de *D. rotundus*, presenta una gran capacidad de distensión y el estómago posee un denso lecho capilar que permite la absorción acelerada del plasma de la sangre ingerida. El líquido es dirigido aceleradamente hacia los riñones para ser excretado con rapidez, con la finalidad de perder peso al emprender el vuelo. Los componentes celulares son digeridos posteriormente durante su paso por el intestino (Neuweiler, 2000).

Una característica notoria del comportamiento de esta especie es el “altruismo”. Debido a que su consumo alimenticio se basa principalmente en componentes proteicos y escasamente en lípidos, sus reservas de grasa son pobres. Por esto los individuos deben alimentarse continuamente y son incapaces de sobrevivir por más de 72 horas sin consumo de alimento. Esto ha favorecido el desarrollo de una conducta en la que los individuos que se alimentaron con éxito regurgitan sangre directamente en la boca de aquellos que no encontraron presa, otorgándoles así la oportunidad de sobrevivir algunas horas más e intentar cazar en la siguiente noche (Neuweiler, 2000).

Las hembras de *D. rotundus* son poliéstricas, y no presentan estacionalidad reproductiva (Villa, 1976; Flores-Crespo, 1992); sin embargo, algunos autores postulan su

pico de nacimientos y la lactancia durante la temporada húmeda, durante primavera y verano (Delpietro *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018). Generalmente dan a luz a una única cría; sin embargo, existen reportes del nacimiento de hasta 2 crías en condiciones de cautiverio (Villa, 1976; Flores-Crespo, 1992). A diferencia de la mayoría de los mamíferos, a excepción de algunos primates, roedores y sorícidos, las hembras de *D. rotundus*, así como algunas otras especies de quirópteros, presentan menstruación (Neuweiler, 2000). La gestación dura alrededor de 6-7 meses (Greenhall *et al.*, 1983). El proceso de lactancia y de dependencia a la madre en la especie es largo, mayor a 5 meses y la alimentación hematófaga se va desarrollando paulatinamente comenzando únicamente a consumir leche materna y con el paso del tiempo comenzará a consumir sangre regurgitada de la madre y las heridas que esta genera para alimentarse (Greenhall *et al.*, 1983; Flores-Crespo, 1992). En cuanto a su conducta sexual, los vampiros se agrupan en harenes con un macho dominante, mismo que no participa en la crianza (Flores-Crespo, 1992; Souza *et al.*, 2018).

La esperanza de vida oscila entre los 12 a 17 años (Villa, 1976; Delpietro *et al.*, 2017) y entre sus principales depredadores se encuentran aves rapaces, reptiles y algunos mamíferos carnívoros (Villa, 1976).

Debido a su importancia en la epidemiología del virus de la rabia, al pasar de los años se han diseñado varios métodos para el control del vampiro común. Algunos de estos métodos representan un grave problema para la conservación de muchas especies de quirópteros y otros animales, debido a que carecen de selectividad y pueden ser sumamente invasivas para los ecosistemas como lo es la quema o bloqueo de los accesos a los refugios, el uso de sustancias tóxicas como pesticidas en el interior de las cuevas, y el uso de explosivos y armas de fuego (Flores-Crespo, 1992; Gonçalves *et al.*, 2021).

Existen también otros métodos aún utilizados actualmente, que fueron desarrollados en México durante los años setenta, que consisten en aprovechar los hábitos sociales de la especie como el acicalamiento y el contacto estrecho constante entre individuos para aplicar una sustancia viscosa combinada con sustancias anticoagulantes y tóxicas para los quirópteros ya sea directamente en el murciélagos o en la presa, cercana a las heridas infligidas por el vampiro, con el fin de ser ingerido y diseminado a otros ejemplares en el mismo refugio o colonia, compuesto comúnmente conocido como vampiricida (Flores-Crespo, 1992;

Gonçalves *et al.*, 2021); sin embargo existen varios estudios en los que se cuestiona la efectividad y seguridad del uso de este método (Ávila-Vargas *et al.*, 2024). Esto ha generado la necesidad de diseñar estrategias más selectivas y menos dañinas hacia los ejemplares de *D. rotundus* y de otras especies como lo es el uso de la vacunación en murciélagos (Aguilar-Setien *et al.*, 1998; Aguilar-Setien *et al.*, 2002).

#### 2.4. Los quirópteros como posibles reservorios de patógenos zoonóticos y enfermedades vectoriales.

Las enfermedades zoonóticas, son causadas por microorganismos infecciosos, que pueden ser transmitidos de manera natural de los animales al ser humano. Se estima que aproximadamente de un 60% de las enfermedades infecciosas conocidas que afectan a la población humana son ocasionadas por patógenos compartidos con otras especies animales tanto domésticos como silvestres, y hasta un 75% de las enfermedades zoonóticas emergentes se atribuyen patógenos originados en reservorios de fauna silvestre. Las actividades humanas invasivas, así como las modificaciones del ambiente propician las interacciones entre animales silvestres, ganado y humanos, promoviendo de esta manera la diseminación de patógenos (Phelps *et al.*, 2019).

La presencia de reservorios silvestres facilita el establecimiento de enfermedades zoonóticas en áreas específicas, generalmente estos reservorios son asintomáticos ante los patógenos que los infectan. Estas enfermedades pueden transmitirse por contacto directo, por medio de animales domésticos o por vectores hematófagos (Calderón *et al.*, 2016).

Un número importante de patógenos detectados en murciélagos, son agentes transmitidos por artrópodos. Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades vectoriales representan el 17% de las enfermedades infecciosas y son causantes de alrededor de 700 mil muertes anuales, estas pueden ser causadas por virus, parásitos o bacterias (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020).

Los murciélagos, constituyen un reservorio importante de agentes zoonóticos, algunos de ellos de alta patogenicidad, responsables de enfermedades emergentes y reemergentes como los virus Nipahvirus, Coronavirus, Filovirus y Lyssavirus, así como

agentes bacterianos y parasitarios (Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2014; Barrón-Rodríguez *et al.*, 2022), algunos de ellos transmitidos por artrópodos.

La capacidad de los murciélagos para albergar y transmitir agentes zoonóticos se atribuye a varias características biológicas, como lo es su capacidad de vuelo a grandes distancias incluyendo especies migratorias, su longevidad que puede superar los 35 años, lo que genera la posibilidad a los patógenos de instaurar infecciones crónicas; su conducta gregaria que favorece la coexistencia de numerosos individuos de la misma o diferentes especies en refugios densamente poblados; además de la gama de mecanismos inmunitarios especializados como el uso de moléculas de reconocimiento de patrones, la ausencia de actividad inflamatoria exacerbada, la secreción de citocinas proinflamatorias y la diversidad de genes VDJ; además de factores antropogénicos (Calderón *et al.*, 2016).

Este grupo de mamíferos además posee una amplia gama de ectoparásitos de los cuales han sido aislados agentes de importancia veterinaria y para la salud pública (Fagre & Kading, 2019), y que potencialmente podrían participar en su transmisión (Lv *et al.*, 2018). Entre los principales ectoparásitos presentes en quirópteros son hemípteros (familia Cimicidae), dípteros (familia Hippoboscoidea), garrapatas (familias Argasidae e Ixodidae) y distintas especies de ácaros (Familias Macronyssidae, Dermanyssidae y Spiturnicidae) (Fagre & Kading, 2019).

Se ha generado evidencia de que los murciélagos son portadores de al menos 24 familias virales (Phelps *et al.*, 2019; Tendu *et al.*, 2022) entre las que se han reportado virus transmitidos por vectores artrópodos. Tanto en murciélagos cautivos como de vida libre, las principales familias de arbovirus presentes son: Asfaviridae, Rhabdoviridae, Orthomixoviridae, Reoviridae, y Flaviviridae. (Kemensi & Banayi, 2019). Así como las familias Filoviridae, Paramyxoviridae, Peribunyaviridae, y Nairoviridae (Tendu *et al.*, 2022).

Gran parte de la investigación en patógenos de murciélagos ha sido enfocada principalmente en agentes virales. Por su parte el estudio de bacterias y otros patógenos con potencial zoonótico y que utilizan algún vector artrópodo, ha ido cobrando cada vez mayor interés e importancia (Afonso & Goydadin, 2018). Evidencia reciente indica que los murciélagos y sus ectoparásitos podrían fungir como reservorios y vectores de agentes zoonóticos bacterianos como *Bartonella mayomanensis*, *Mycoplasma haemathominis* y

*Anaplasma phagocytophilum* (de Mello *et al.*, 2023a), *Neorickettsia* spp, *Ehrlichia* spp (Ikeda *et al.*, 2021) y parásitos de los géneros *Babesia*, *Theileria* y *Trypanosoma* entre otros (de Mello *et al.*, 2023a).

Existen reportes de diferentes partes del mundo en los que se ha encontrado material genético de agentes bacterianos transmitidos por vectores. Se han identificado los géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Babesia* en garrapatas *Argas verpertilionis* parasitando murciélagos del oeste de Europa (Sokolovschi *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2018). Hornok *et al.* (2019) identificó la presencia del género *Rickettsia* en argásidos y *Anaplasma* y *Bartonella* principalmente en garrapatas presentes en murciélagos de 8 países distintos, incluido México.

En el medio silvestre, los mosquitos transmiten agentes patógenos, principalmente arbovirus a animales susceptibles, como algunos primates no humanos, en lo que es denominada ciclo de transmisión selvático. La intrusión en zonas conservadas con actividades como la cacería, el cambio de uso de suelo, el tráfico de ejemplares silvestres, la deforestación; así como el cambio climático, entre otras, puede aumentar las posibilidades de que los humanos se infecten en dichas zonas o que los vectores infectados se desplacen a sitios urbanizados, donde las infecciones son amplificadas y diseminadas por especies de vectores como los mosquitos que habitan los entornos urbanos, lo que puede resultar en una epidemia o pandemia, si los brotes inician en regiones tropicales con alta densidad poblacional, aunque pueden presentarse únicamente los niveles necesarios de transmisión para mantener a los patógenos circulando entre la población (Valentine *et al.*, 2019).

Los ciclos selváticos son de gran importancia para la salud pública, debido a que sirven para que los patógenos, como los arbovirus, continúen circulando en reservorios animales, y permite la reemergencia de las enfermedades que causan cuando los niveles de inmunidad de la población han menguado. Además, estos ciclos proporcionan un ambiente adecuado para la generación de nuevas variantes virales con distinto potencial de virulencia para los humanos (Valentine *et al.*, 2019).

A pesar de la importancia ecológica de los murciélagos y sus ectoparásitos hematófagos, se conoce poco acerca del papel que juegan en las dinámicas de transmisión de ciertos patógenos, así como sobre la competencia real de los murciélagos para fungir como reservorios de éstos (Fagre & Kading, 2019).

## 2.5 *Rickettsia* spp.

Las rickettsiosis son un grupo de infecciones causadas por las bacterias intracelulares obligadas, Gramnegativas del género *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) con capacidad de replicación tanto en el citoplasma como, para algunas especies, en el núcleo de la célula hospedera. Estos microorganismos son agentes causales de enfermedades importantes en humanos y animales como el tifus epidémico, el tifus murino y la fiebre maculosa de las montañas rocosas, entre otras (Álvarez-Londoño *et al.*, 2024).

Poseen tropismo por células endoteliales, y son transmitidas principalmente mediante la picadura o inoculación de vectores artrópodos tales como ácaros, garrapatas, pulgas (sifonápteros) y piojos (ftirápteros) (Ulloa, *et al.*, 2019; Álvarez-Londoño *et al.*, 2024). Los agentes rickettsiales son de relevancia en salud pública a nivel global; sin embargo, su prevalencia y distribución son variables y dependen de factores regionales y de la presencia de vectores competentes para su transmisión (Suarez-Galaz *et al.*, 2025).

Actualmente, el género *Rickettsia* está compuesto por 35 especies divididas en grupos filogenéticos. La clasificación más aceptada los organiza en los siguientes grupos denominados: Grupo del tifus (grupo *typhus*), Grupo de las Fiebres Manchadas (grupo *spotted fever*), Grupo ancestral, Grupo Intermedio y Grupo Transicional (Álvarez-Londoño *et al.*, 2024; Suarez-Galaz *et al.*, 2025). De las especies descritas, 18 han sido asociadas con infecciones y enfermedades en humanos en diversas partes del mundo (Suarez-Galaz *et al.*, 2025).

Las especies de mayor relevancia por su virulencia y patogenicidad humana se encuentran en el Grupo del Tifus que incluye a *Rickettsia prowazekii* (agente causal del tifus epidémico) y *Rickettsia typhi* (agente causal del tifus murino); y en el Grupo de Fiebres Manchadas, que incluye a con las especies *Rickettsia conorii* (causante de la fiebre botonosa mediterránea) y *Rickettsia rickettsii* (agente etiológico de la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas) (Suarez-Galaz *et al.*, 2025).

En México, se han registrado casos de infecciones en humanos principalmente por 5 especies del género: *R. prowazekii*, *R. rickettsii*, *R. felis*, *R. typhi* y *R. akari*; sin embargo,

se han detectado otras especies en garrapatas de México, como lo son *R. amblyommatis*, *R. belli*, *R. lusitanae* y *R. parkeri* (Ulloa *et al.*, 2019).

Los ciclos de transmisión de los agentes rickettsiales conlleva las interacciones entre un vector, un reservorio y un hospedante accidental humano, estas interacciones suelen llevarse a cabo frecuentemente en ambientes de precariedad y analfabetismo (Caamal-Itza *et al.*, 2025).

#### 2.5.1. Rickettsias detectadas en quirópteros

Existe evidencia molecular y serológica de la presencia de diversas especies del género *Rickettsia* en muestras de murciélagos y sus ectoparásitos (como moscas, ácaros y garrapatas) (Dietrich *et al.*, 2016; Do Amaral *et al.*, 2018; Szentivanyi *et al.*, 2023). La detección de genotipos idénticos en ectoparásitos y en tejidos de murciélagos sugiere la capacidad vectorial de estos artrópodos; no obstante, se requieren más estudios corroborar o descartar esta hipótesis, así como para elucidar el rol que los quirópteros desempeñan en la epidemiología y las dinámicas de transmisión de las rickettsiosis (Dietrich *et al.*, 2016).

A continuación, se presenta una revisión de los trabajos de vigilancia epidemiológica realizados para detectar la presencia de agentes rickettsiales en murciélagos y sus ectoparásitos:

- **Corea 2006:** Un estudio serológico mediante inmunofluorescencia indirecta detectó anticuerpos contra *Orientia tsutsugamushi* (antes clasificada en el género *Rickettsia*) en roedores y murciélagos (Choi & Lee, 1996).
- **Estados Unidos, 2005-2006:** se detectaron anticuerpos contra *R. rickettsii* mediante inmunofluorescencia indirecta en suero de un ejemplar de *Eptesicus fuscus* (Reeves *et al.*, 2006).

- **México (Yucatán), 2016:** Se detectó material genético de *Rickettsia lusitanae* mediante PCR en garapatas *Ornithodoros yumatensis* parasitando murciélagos (Sánchez-Montes *et al.*, 2016).
- **Brasil 2007-2008:** se llevó a cabo un estudio en Brasil, en el cual se estudiaron sueros de ejemplares de las familias Molossidae, Phyllostomidae y Vespertilionidae, por medio de inmunofluorescencia indirecta, obteniendo resultados positivos para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* y *R. belli* (D'Auria *et al.*, 2010).
- **Francia, 2012:** Un estudio molecular detectó secuencias relacionadas con *Rickettsia peacockii*, *R. africae* y *R. conorii* en garapatas *Argas vespertilionis* asociadas a murciélagos (Socolovschi *et al.*, 2012).
- **Antillas, 2016:** Se detectó ADN de *Rickettsia* sp. mediante PCR en sangre completa de los murciélagos *Artibeus jamaicensis* y *Ardops nichollsi* (Reeves *et al.*, 2016).
- **Sudáfrica y Suazilandia, 2016:** Se detectó *Rickettsia* spp. mediante PCR en garapatas asociadas a *Rousettus aegyptiacus* y en sangre de 5 especies de murciélagos: *Miniopterus natalensis*, *Nycteris thebaica*, *Epomophorus wahlbergi*, *Scotophilus dinganii* y *Glauconycteris variegata* (Dietrich *et al.*, 2016).
- **Polonia, 2016:** El estudio de garapatas *Ixodes ricinus* parasitando *Rhinolophus hipposideros* y *Myotis myotis* mediante PCR y PCR anidado, detectó secuencias similares a *Rickettsia helvetica* (Piksa *et al.*, 2016).
- **Guyana Francesa, 2016:** Se detectó ADN de *Rickettsia* spp en garapatas *Ornithodoros hasei* (Tahir *et al.*, 2016).

- **Argentina, 2017:** Se detectó material genético de *Rickettsia* spp. mediante PCR en ejemplares de *Tadarida brasiliensis* (Cicuttin *et al.*, 2017).
- **Reino Unido, 2018:** Se detectaron secuencias homólogas a *R. conorii* y *R. sibirica* mediante PCR en garrapatas *A. vespertilionis* colectadas de *Pipistrellus pipistrellus* y *Plecotus auritus* (Lv *et al.*, 2018).
- **Brasil, 2018:** Se detectaron secuencias similares a *Rickettsia andeanae* mediante PCR en moscas parásitas (*Trichobius joblingi*) de un ejemplar de *Carollia perspicillata* (Do Amaral *et al.*, 2018).
- **Polonia, 2019:** Se detectaron secuencias relacionadas con *R. massiliae*, “*Candidatus Rickettsia barbarie*”, *Rickettsia* sp. AvBat, “*Candidatus Rickettsia wissemanni*” y “*Candidatus Rickettsia nicoyana*” mediante PCR en ácaros *Spiturnix myoti* parasitando *Myotis myotis* (Szubert-Kruszyńska *et al.*, 2019).
- **Brasil (Amazonía), 2019:** Se detectó material genético relacionado con “*Candidatus Rickettsia wissemanni*” mediante PCR en un grupo de larvas de *Ornithodoros hasei* que parasitaban *Artibeus planirostris* (Luz *et al.*, 2019).
- **Múltiples países (Incluido México), 2019:** Se detectó *Rickettsia* spp. mediante PCR en garrapatas de los géneros en garrapatas de los géneros *Argas* y *Ornithodoros* colectadas de *Pipistrellus hesperidus*, *P. pipistrellus* y *Balantiopteryx plicata* (Hornok *et al.*, 2019).
- **China, 2020:** Se detectó ADN de *Rickettsia parkeri*, *R. lusitaniae*, *R. slovaca* y *R. raoultii* en *Pipistrellus pipistrellus* y en garrapatas *Argas vespertilionis*, asociadas (Zhao *et al.*, 2020).

- **Namibia, 2020:** Se detectó *Rickettsia hoogstraalii* y *Rickettsiella* sp. mediante técnicas moleculares en larvas de *Argas transgariepinus* parasitando *Eptesicus hottentotus* (Reeves *et al.*, 2020).
- **Rumania, 2021:** Se detectaron secuencias de *Rickettsia* spp. y *R. monacensis* mediante PCR en tejido cardiaco de *Nyctalus noctula* y *Pipistrellus pipistrellus* (Matei *et al.*, 2021).
- **México (Yucatán), 2021:** Se detectaron secuencias con homología cercana a *Rickettsia rickettsi*, *R. felis* y *R. typhi* mediante PCR anidado, en muestras de bazo de *Artibeus jamaicensis* (Lugo-Caballero *et al.*, 2021).
- **Suecia, 2023:** Se detectaron secuencias de *Rickettsia rickettsi*, *R. parkeri* y *R. conorii* mediante PCR en garrapatas *Carios vespertilionis* parasitando *Pipistrellus pygmaeus* (Tompa *et al.*, 2023).

Hasta la fecha no existen estudios publicados en los que se hayan reportado la presencia de alguna especie de *Rickettsia* en tejidos ni en ectoparásitos de *D. rotundus*.

## 2.6. Piroplasmida

Los protozoarios pertenecientes al orden Piroplasmida (phylum Apicomplexa) son microorganismos intracelulares transmitidos por garrapatas ixódidas que comprenden los géneros *Babesia*, *Theileria* y *Cytauxzoon*. Estos agentes parasitan células sanguíneas, (eritrocitos y en el caso de *Theileria*, también leucocitos) de vertebrados domésticos y silvestres, y de ser humano, pudiendo causar enfermedades graves (Ikeda *et al.*, 2020).

### 2.6.1. Piroplásmidos detectados en quirópteros

Existe evidencia molecular y serológica de la presencia de piroplásmidos en murciélagos y sus ectoparásitos (garrapatas), las cuales se exponen a continuación:

- **Italia, 1899:** La primera descripción morfológica de piroplasmas en murciélagos se realizó por Dionisi, quien los observó en frotis sanguíneos de ejemplares de *Nyctalus noctula* y *Pipistrellus* sp. (de Mello *et al.*, 2023a).
- **Colombia, 1996:** Se obtuvieron frotis con distintos estadios de *Babesia* sp, en ejemplares de *Moormops megalophylla*, donde el autor hipotetizó que se trata de *B. vesperuginis* (Marinkelle, 1996). Este reporte es considerado como la primera detección documentada de la presencia del género *Babesia* en murciélagos del continente americano (Marinkele, 1996).
- **Reino Unido, 2005:** Por su parte, la primer detección molecular fue realizada por Concannon y colaboradores en murciélagos del género *Pipistrellus*, en los cuales detectaron material genético de *B. vesperuginis*, además de otros hemoparásitos de los géneros *Trypanosoma* y *Bartonella* (Concannon *et al.*, 2005).
- **Hungría y Países Bajos, 2015:** se reportaron fragmentos de material genético asociados a *Babesia canis* en muestras de heces de *Nyctalus noctula*, *Pipistrellus pygmaeus*, *Myotis daubentonii* y *M. alcathoe*; además de la presencia de secuencias similares a *Besnoitia besnoiti* en heces de *M. dasycneme* (Hornok *et al.*, 2015).
- **Hungría y Rumania, 2016:** Se realizó la detección de secuencias de *Theileria* spp., *Babesia verperuginis*, *B. crassa*, *B. canis* y *B. venatorum* en ixódidos que parasitan murciélagos (Hornok *et al.*, 2016).
- **Hungría y China, 2017:** Se detectaron secuencias de *Babesia verperuginis* en *Argas vespertilionis* que parasitaban ejemplares de las especies *Eptesicus serotinus*, *Plecotus auritus*, *Pipistrellus pipistrellus* y *Vespertilio murinus* (Hornok *et al.*, 2017).

- **Varios países de Europa, 2017:** *Babesia vesperuginis* también ha sido detectada en ectoparásitos asociados a murciélagos en Austria, República Checa y Rumania (Corduneanu *et al.*, 2017).
- **China, 2018:** Se realizó la detección de material genético de *Babesia verperuginis* en muestras de sangre de ejemplares de *Eptesicus serotinus* (Han *et al.*, 2018).
- **Madagascar, 2019:** Fueron detectadas por medio de PCR, secuencias relacionadas con *B. microti* en sangre de *Pteropus rufus* (Ranaivoson *et al.*, 2019).
- **Brasil, 2020:** Se analizaron muestras de sangre y bazo, en las cuales fue detectado material genético de *Hepatozoon* sp. por medio de PCR en *Carollia perspicillata* y *Artibeus lituratus* (Santos *et al.*, 2020).
- **Brasil, 2021:** Se detectó material genético asociado a *B. vogeli* en especies del género *Artibeus* así como de nuevos piroplásmidos en la especie *Phyllostomus discolor*, ambos estudios realizados en Brasil (Ikeda *et al.*, 2021)
- **República Checa, 2022:** se reportó la presencia de *B. vesperugnis* en *N. noctula* y se asoció la infección con alteraciones hematológicas durante la hibernación (Linhart *et al.*, 2022).
- **Brasil, 2023:** Se reportó la presencia de material genético de *Babesia* sp. (previamente detectada en *Nasua nasua* y *Didelphis* spp.) y de *Theileria* sp. (asociada a *Tapirus terrestris*) en muestras de bazo de *D. rotundus* (de Mello *et al.*, 2023a).
- **Lituania, 2024:** Se analizaron muestras de sangre y órganos de 8 especies de murciélagos mediante micoscopía, RT-PCR y nPCR, los cuales dieron

resultados positivos a *Babesia verperuginis* en *Pipistrellus nathussi*, *P. pygmaeus*, *Vespertilio murinus*, *Eptesicus nilssonii* y *E. serotinus* (Sakalauskas *et al.*, 2024).

## 2.7. *Orthoflavivirus*.

La familia Flaviviridae del latín *Flavus*= amarillo (Porterfield, 1986), comprende un grupo de virus entre los que se encuentran algunos agentes con importancia zoonótica. Son virus cuyo material genético se compone por una molécula de RNA de polaridad positiva (+ssRNA) por lo que pertenece al grupo IV de la clasificación de Baltimore. El genoma de estos virus posee la misma polaridad que el RNA mensajero contenido en la célula hospedadora, lo que les provee la capacidad de tomar ventaja de los mecanismos celulares, ser capaces de traducir sus proteínas directamente y modificar algunos sistemas membranosos como el retículo endoplásmico, para establecer complejos replicativos (Denison, 2008; van den Elsen *et al.*, 2021).

Los virus de la familia *Flaviviridae* se dividen en 4 géneros y 97 especies (Simmonds *et al.*, 2023): *Hepacivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* y *Orthoflavivirus*. Dentro de este último género se encuentran cerca de 50 especies (Kemensi & Bányai, 2019) cuyos ciclos biológicos y transmisión involucran principalmente artrópodos hematófagos como vectores y hospedantes vertebrados como mamíferos y aves (Kemenesi & Bányai, 2018; Charles *et al.*, 2021; Simmonds *et al.*, 2023).

**Cuadro 2.** Características de los 4 géneros de la familia Flaviviridae

Género	Tamaño del genoma	Hospedantes	Mecanismo de transmisión	Agentes de importancia
<i>Orthoflavivirus</i>	9.2-11 kb	Mamíferos silvestres y domésticos. Aves. Artrópodos (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Vectorial: mosquitos y garrapatas. Transovárica, transestadial y de artrópodo a artrópodo (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Virus de la fiebre amarilla (YFV), Virus del dengue (DENV), Virus de la encefalitis japonesa (JEV), Virus del Nilo Occidental (WNV), Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), Virus Zika (ZIKV), <i>Louping ill</i> virus (LIV), Powassan virus (POWV), Virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), Kiasanur Forest disease virus (KFDV) (Simmonds <i>et al.</i> , 2017). Taman bat virus (TABV) (Blitvich & Firth, 2017).
<i>Hepacivirus</i>	8.9-10.5 kb	Quirópteros (Epstein <i>et al.</i> , 2010), roedores, équidos, bovinos, cánidos y sorcidos (Simmonds <i>et al.</i> , 2017; Guo <i>et al.</i> , 2023), así como primates humanos y no humanos (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Exposición a sangre o productos sanguíneos contaminados (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Virus de la hepatitis C (HCV), Virus B tipo B (GBV-B) (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).
<i>Pegivirus</i>	8.9-11.3 kb	Quirópteros, roedores, équidos, sidos, primates humanos y no humanos (Quan <i>et al.</i> , 2013; Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Vía sexual., contacto con sangre, rutas parenteral y vertical (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Pegivirus humano (HPgV), Pegivirus equino (EPgV), Pegivirus de murciélagos (BPgV), Pegivirus símico GB (SPgV/GBV), Pegivirus de roedor (RPgV), Pegivirus porcino (PPgV) (Quan <i>et al.</i> , 2013; Simmonds <i>et al.</i> , 2017)
<i>Pestivirus</i>	12.3-13 kb (s)	Quirópteros, roedores, mariposas, pangolines, sidos domésticos y silvestres. Rumiantes domésticos y silvestres (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Contacto directo o indirecto por medio de orina, secreciones nasales, heces, alimentos contaminados, transplacentaria (Simmonds <i>et al.</i> , 2017).	Virus de la diarrea viral bovina (BVDV), Virus de la Fiebre porcina clásica (CSFV) (Simmonds <i>et al.</i> , 2017), Virus de la enfermedad de la frontera (BDV) (WOAH, 2017).

El género *Flavivirus* u *Orthoflavivirus*, renombrado recientemente por el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV) en 2022 (Postler *et al.*, 2023). Comprende hasta la fecha un total de 53 especies, la mayoría transmitidas por vectores artrópodos (Postler *et al.*, 2023; International Comitee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2024). Los *Orthoflavivirus* son clasificados en 4 grupos de acuerdo con su vector:

*Orthoflavivirus* transmitidos por garrapatas, *Orthoflavivirus* transmitidos por mosquitos, *Orthofavivirus* con clasificación pendiente y *Orthoflavivirus* con vector desconocido (Brinton & Basu, 2015). Este último grupo comprende algunos virus que circulan en las poblaciones de ciertas especies de roedores y murciélagos, y de los cuales se desconoce la participación de algún vector para su transmisión (ICTV, 2024).

**Cuadro 3.** Clasificación taxonómica actual de la familia Flaviviridae (ICTV, 2025; Simmonds *et al.*, 2023).

<b>Dominio</b>	Riboviria
<b>Reino</b>	Orthonavirae
<b>Phylum</b>	Kitrinoviricota
<b>Clase</b>	Flasuviricetes
<b>Orden</b>	Amarillovirales
<b>Familia</b>	Flaviviridae
<b>Género</b>	<i>Orthoflavivirus</i>

El género viral en cuestión incluye agentes causantes de enfermedades emergentes y reemergentes de gran importancia para la medicina veterinaria y para la salud pública causando importantes brotes y epidemias en varios países alrededor del mundo (Hayman, 2016; Pierson & Diamond, 2020), particularmente en el sudeste asiático y América Latina (Renner *et al.*, 2021), provocando un espectro de enfermedades severas que cursan con encefalitis, anomalía y muerte fetal, hepatitis, shock vascular, parálisis aguda y fiebres hemorrágicas (Pierson & Diamond, 2020; Zhang *et al.*, 2021; Simmonds *et al.*, 2023). Entre los principales agentes causales de estas enfermedades están: el virus del Dengue (DENV), Fiebre Amarilla (YFV), Zika (ZIKV), Encefalitis Japonesa (JEV), Virus del Nilo Occidental (WNV), Virus Powassan (POWV) y Encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), entre otros (Mlera & Bloom, 2018; Pierson & Diamond, 2020; Renner *et al.*, 2021; van den Else *et al.*, 2021; Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2024).

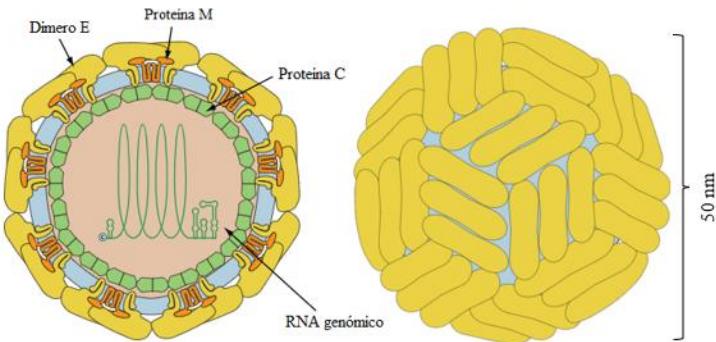
Existen vacunas para pocos virus de este extenso grupo y no existen fármacos antivirales para el tratamiento de las infecciones generadas por *Orthoflavivirus*. Por lo tanto, el estudio y la comprensión de la biología, inmunología y epidemiología de estos agentes son cruciales

para la generación de vacunas y tratamientos efectivos (van den Else *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021).

La morfología general de los viriones del género *Orthoflavivirus* es esférica y presenta una envoltura lipídica. Su tamaño promedio es de 50 nm, y se compone por una cápside icosaédrica (Kemenesi & Bányai, 2018; Renner *et al.*, 2021; ICTV, 2024; ViralZone, 2024) formada por 180 copias de la proteína E y prM/M (Kostyuchenko *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2020). Los viriones son ensamblados a partir de una molécula de (+) ssRNA genómico y 3 proteínas estructurales denominadas C (cápside), E (envoltura) y prM (premembrana)/ M (membrana), rodeadas por una membrana lipídica tomada de la célula hospedadora (Pierson & Diamond, 2020).

Existen dos diferentes conformaciones del virión en las que las proteínas de superficie sufren cambios estructurales significativos: la forma inmadura, principalmente intracelular, y cuya superficie posee heterodímeros de la proteína E y un precursor de la proteína de membrana (prM); y la forma madura, extracelular e infectiva, donde el precursor de la proteína M ha sido escindido por proteasas celulares como la enzima furina para su maduración y salida de la célula por medio de exocitosis (Stadler *et al.*, 1997; Zhang & Ge *et al.*, 2012; van den Else *et al.*, 2021; ICTV, 2024).

El retículo endoplásmico, lugar donde inicialmente son ensamblados los viriones posee un pH neutro, en el cual el estadio inmaduro muestra 60 espículas constituidas a su vez por 60 trípodes invertidos entrecruzados entre sí, y cada uno de estos trípodes se encuentra conformado por 3 heterocomplejos de las proteínas prM-E, los cuales se encuentran anclados a la membrana lipídica por sus dominios transmembranales (Tan *et al.*, 2020).

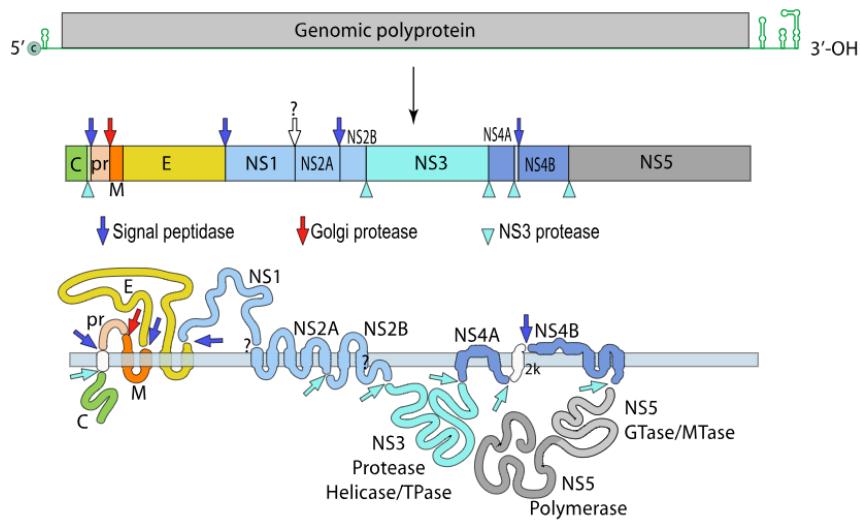


**Figura 4.** Esquema general de los viriones de la familia Flaviviridae (Ilustración modificada de ViralZone).

Los virus pertenecientes al género *Orthoflavivirus* poseen un genoma de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva con un tamaño aproximado de 9.2-11 kb (Blitvich & Firth, 2017; Kemenesi & Bányai, 2018; ICTV, 2024; ViralZone, 2024). El genoma codifica una región no traducida (UTR) en el extremo 5' (Charles *et al.*, 2021) de aproximadamente 100 nucleótidos (Kemenesi & Bányai, 2018; Zhang *et al.*, 2021) un único marco abierto de lectura (ORF) y una UTR en el extremo 3' (Charles *et al.*, 2021) de 400 -700 nucleótidos (Kemenesi & Bányai, 2018; Zhang *et al.*, 2021)

En el extremo 5' del ARN genómico posee una cap tipo I seguido de un dinucleótido AG conservado. El extremo 3' carece de cola poli(A) y termina en una estructura secundaria con forma de tallo-bucle (stem-loop) (Kemenesi & Bányai, 2018; ICTV, 2024; ViralZone, 2024).

El ORF codifica una poliproteína grande que es escindida por proteasas virales y del hospedador para generar las tres proteínas estructurales, de las que está constituida la partícula viral: proteína C, proteína prM/M y proteína E, además de las 7 proteínas no estructurales (NS1-NS5), involucradas en la replicación viral. El orden de las proteínas en el genoma de los *Orthoflavivirus* es: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5-3' (Charles *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2023).



**Figura 5.** Esquema de la organización del genoma de los virus del género *Orthoflavivirus* (Ilustración modificada de ViralZone).

### 2.7.1 Proteínas estructurales

#### Proteína E

La proteína E de una glicoproteína con forma de bastón, de aproximadamente 50 kDa, que se encuentra dispuesta en una posición paralela a la membrana sin formar proyecciones hacia el exterior de la partícula viral. Los homodímeros de esta proteína se encuentran ordenados en una disposición con forma de espiga que recubre al virión. Esta proteína es la hemaglutinina viral y media la unión del virión a su receptor en la membrana celular y la fusión dependiente de pH ácido posterior a la endocitosis mediada por receptor (ICTV, 2024).

La proteína E es el mayor componente de la estructura de la superficie de los flavivirus, en su porción extracelular se pueden diferenciar 3 dominios estructurales denominados: DI, DII y DIII y que se encuentran interconectados por medio de regiones flexibles, los cuales permiten su reordenamiento durante los procesos de ensamblaje y maduración de los viriones (Kostyuchenko *et al.*, 2013).

## Proteína M

La proteína de membrana posee dos formas funcionales. En el virión inmaduro, se sintetiza como un precursor denominado prM (proteína precursora de membrana), que estabiliza la proteína E e impide la fusión prematura del virión con las membranas intracelulares de la célula hospedadora. Durante la maduración, la proteasa celular furina escinde el dominio N-terminal de prM, liberando el péptido “pr” y permitiendo que la porción C-terminal restante (la proteína M madura) se ancle firmemente a la membrana del virión, formando una proteína de transmembrana (Kemenesi & Bányai, 2018).

## Proteína C

La proteína de la cápside (C) es un monómero de 11 kDa, constituida por 114 aminoácidos (Zhao *et al.*, 2021). Está formada por 4  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 4) unidas por asas cortas en cuya disposición se encuentran  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 4 en distintas capas, y  $\alpha$ 3 media la función la unión entre dos monómeros, formando un dímero proteico de proteína de la cápside (Tan *et al.*, 2020). Puede encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula infectada (Zhang *et al.*, 2021).

La proteína C es la primera en ser traducida a partir del genoma de los flavivirus, y posee un papel crucial en la interacción con el ARN para su empaquetamiento dentro del virión durante el proceso de ensamblaje, brindándole protección y participando en la formación de la envoltura, la infectividad (Tan *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021). Su dominio N terminal posee una interfaz cargada positivamente lo que le confiere una gran afinidad para interactuar con la carga negativa del ARN genómico. Esta interacción resulta en la formación de la nucleocápside, un complejo constituido por múltiples copias de proteína C y una única molécula de ARN genómico, necesario para la producción de viriones infecciosos (Kemenesi & Bányai, 2018; Zhao *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

También se encarga en parte de la maduración del virión, antes de que esta sea escindida por proteasas virales, permanece en fase inmadura denominada C anclada a membrana (anchC) misma que posee la capacidad para realizar el ensamblaje de los flavivirus, lo que propicia la escisión del precursor de la proteína M (prM) induciendo la maduración del virión (Zhang *et al.*, 2021).

## 2.7.2. Proteínas no estructurales

### NS1

Se trata de una glicoproteína no estructural, altamente conservada con un peso molecular de 46 a 55 kDa dependiendo de su grado de glicosilación (Rastogi *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2021) misma que es clave para su secreción y la virulencia y replicación viral (Rastogi *et al.*, 2016).

Existen distintas formas de NS1, como monómero al ser recién sintetizada; como dímero asociado a la membrana plasmática y compartimentos intracelulares; y como hexámero soluble, secretado en suero, saliva, líquido cefalorraquídeo y orina (Zhao *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2023) posee una vida media en plasma de 1 hora y puede ser usada para la realización de diagnóstico de infecciones flavivirales por medio de técnicas de detección de antígenos y anticuerpos (Fisher *et al.*, 2023).

La proteína NS1 es indispensable para llevar a cabo la replicación eficiente del ARN, posee la capacidad de modular la permeabilidad del endotelio, lo que se relaciona con cuadros severos de algunas enfermedades causadas por flavivirus como el Dengue hemorrágico (Zhao *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2023).

### NS2A y NS2B

La proteína no estructural NS2A se trata de una proteína transmembranal de aproximadamente 25 kDa, que posee diferentes funciones, mismas que dependen de la especie del *Orthoflavivirus* en cuestión. Se requiere para los procesos de síntesis de ARN, la formación de los complejos replicativos y el ensamblaje, maduración y secreción de los viriones; además está involucrada en el transporte del ARN viral (Latanova *et al.*, 2022).

Por su parte NS2B es una proteína integral de membrana de cerca de 14 kDa, esta interactúa con otras proteínas como NS2A para realizar actividades relacionadas con la

replicación y ensamblaje de los viriones, también actúa como viroporina con capacidad de oligomerizar y modificar la permeabilidad de las membranas; y es necesaria para la activación de la proteasa NS3 (Latanova *et al.*, 2022).

### NS3

La proteína NS3 es una proteína de 69 kDa, misma que posee un dominio N terminal con actividad de proteasa similar a quimotripsina, la cual permite la escisión cis y trans de la poliproteína viral para generar el resto de las proteínas no estructurales y actividad NTPasa y Helicasa de RNA (Latanova *et al.*, 2022).

### NS4A y NS4B

NS4A posee un peso molecular de aproximadamente 16 kDa, posee un dominio transmembranal, posee actividad importante involucrada en el reordenamiento de membranas en la formación de los complejos replicativos, así mismo interactúa con NS1, NS2A y NS5, e induce autofagia en virus como ZIKV y DENV. Por su parte NS4B posee una masa molecular de 27 kDa en su conformación madura y posee un dominio transmembranal, mismo que juega un papel importante dentro de la formación del complejo replicativo mediante las interacciones con NS1, NS3 y NS4A (Latanova *et al.*, 2022).

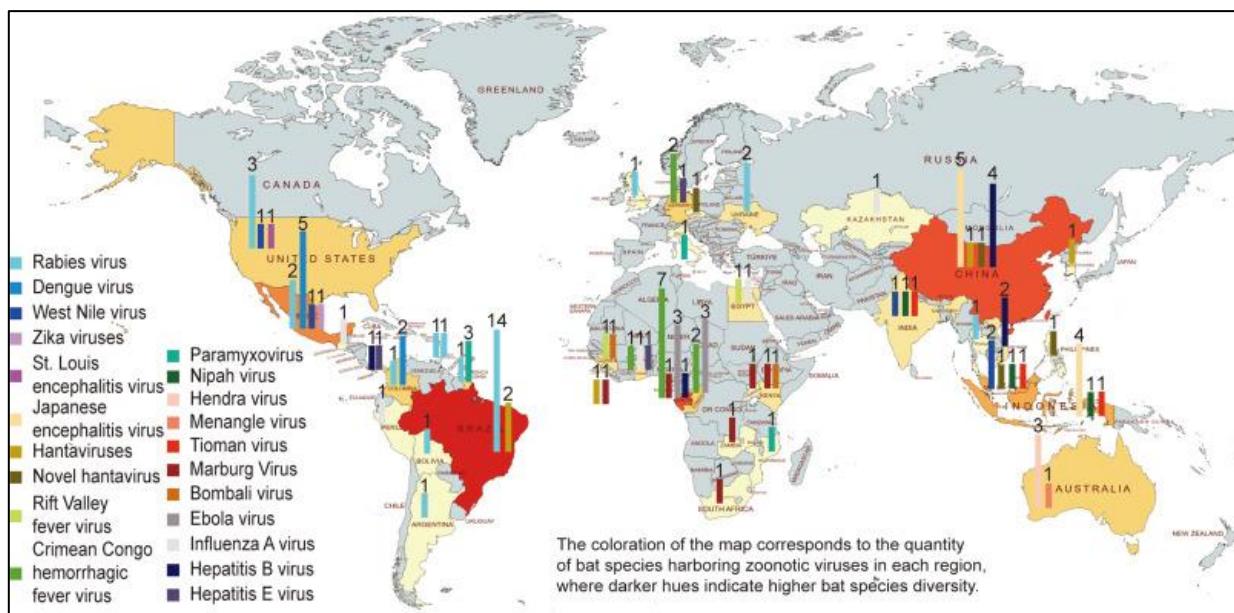
### NS5

La proteína no estructural NS5, es la proteína más conservada entre los miembros del género *Orthoflavivirus*, posee un peso molecular de 105 kDa, el dominio N-terminal tiene actividad metiltransferasa, responsable de la formación del cap. El dominio C-terminal de NS5 funge como ARN polimerasa dependiente de ARN, actividad responsable de la replicación del genoma, además de interactuar para formar un complejo con NS3 para la replicación viral (Lantova *et al.*, 2022).

### 2.7.3. *Orthoflavivirus* en quirópteros

Los murciélagos actúan como reservorios de una variedad de virus que afectan seriamente la salud de los seres humanos; sin embargo, debido a su particular sistema inmunológico, son capaces de soportar infecciones virales crónicas sin los efectos patológicos letales que ocurren en otros mamíferos (Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2024).

Los análisis filogenéticos actuales sugieren que varios agentes virales de importancia en salud pública se originaron en virus de murciélagos como los virus de la parotiditis y el sarampión (Hayman, 2016), así como algunos coronavirus, lyssavirus, henipavirus y filovirus entre otros (Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2024).



**Figura 6.** Mapa de distribución de murciélagos con evidencia de la presencia de agentes virales zoonóticos.  
(Tomado de Liu *et al.*, 2024).

La familia Flaviviridae, que contiene una cantidad importante de virus zoonóticos, es la segunda familia viral más reportada en murciélagos, (Turmelle & Olival, 2010; Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2018). Precedida en primer lugar por la familia Rhabdoviridae y seguido por la familia Paramyxoviridae en el tercer sitio (Turmelle & Olival, 2010), además, se ha obtenido evidencia de que los murciélagos son reservorios importantes de los 4 géneros de

la familia Flaviviridae: *Pegivirus* y *Hepacivirus* a los cuales pertenecen patógenos zoonóticos como los virus de las hepatitis C y G (Hayman, 2016), *Pestivirus* (Wu *et al.*, 2018) y *Orthoflavivirus* como el DENV (Kading & Schountz., 2016).

Sin embargo, el papel que estos juegan como posibles reservorios de *Orthoflavivirus* tales como el DENV permanece poco claro, además de ser un tema controversial debido a que existe evidencia serológica y molecular obtenida de diversos estudios con resultados positivos en distintas especies de murciélagos a DENV; sin embargo, también existen diferentes estudios con considerable cantidad de individuos y especies en los cuales se han

Se han detectado anticuerpos, material genético o incluso se han aislado varios virus del género *Orthoflavivirus* a partir de muestras de murciélagos infectados naturalmente. Estos pertenecen principalmente al grupo de flavivirus sin vector conocido como el virus Bukalasa bat (BBV), virus de Rio Bravo (RBV) y el virus Dakar bat (DBV), que han sido aislados a partir de tejido proveniente de glándulas salivares de algunas especies, lo que sugiere un posible mecanismo de transmisión directa por mordedura. También han sido aislados flavivirus transmitidos por mosquitos de importancia en salud pública como el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) y JEV. Así mismo existen varios virus emparentados filogenéticamente dentro del grupo de flavivirus transmitidos por mosquito como Entebe bat virus (ENTV) y Yokose virus (YOKV) que aún no han sido aislados de mosquitos colectados en campo y se desconoce su vector, esto sugiere su competencia como hospedantes amplificadores de algunos virus del género *Orthoflavivirus* (Kading & Shountz, 2016).

Se han realizado varios estudios para determinar la susceptibilidad de algunas especies de murciélagos frugívoros al DENV mediante infecciones experimentales (Moreira-Soto *et al.*, 2017; Irving *et al.*, 2020; Aguilar-Setién *et al.*, 2023; Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2024). Los resultados obtenidos en varios trabajos sobre la susceptibilidad de la infección por DENV sugieren que las especies utilizadas como modelos en dichos estudios no sirven de manera eficiente como hospedantes amplificadores o como reservorios, y por tanto no poseen un rol relevante dentro de la dinámica de la transmisión del virus. Estos trabajos han generado información valiosa; sin embargo, los datos obtenidos hasta la fecha resultan aun escasos para determinar que los quirópteros no podrían fungir como reservorios de DENV debido a la gran diversidad de especies de murciélagos existentes (Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2024).

**Cuadro 4.** Distribución de *Orthoflavivirus* detectados en diversas especies de murciélagos. (Rajalopagan *et al.*, 1960; Allen *et al.*, 1970; Kading & Schountz, 2016; Blitvich & Firt., 2017; Fagre & Kading, 2019; Gwee *et al.*, 2021; Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

Virus	Distribución	Especies de murciélagos reportadas	Zoonótico
<b>Rio Bravo Virus (RBV)</b>	México, EE. UU., Trinidad	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> , <i>Eptesicus fuscus</i> , <i>Molossus rufus</i> .	✓
<b>Entebbe Bat Virus (EBV)</b>	Uganda	<i>Chaerophon pumilus</i> , <i>Mops condylurus</i> .	-
<b>Montana Myotis Leucoencheaphalitis Virus (MMLV)</b>	EE. UU.	<i>Myotis lucifugus</i>	-
<b>Dakar Bat Virus (DBV)</b>	Madagascar, Uganda, Nigeria, Senegal.	<i>Chaerophon pumilus</i> , <i>Scotophilus nigrita</i> , <i>Mops condylurus</i> , <i>Taphozous perforatus</i> .	✓
<b>Banzi virus (BANV)</b>	África	<i>Eidolon helvum</i> , <i>Epomophorus anuras</i> , <i>Miniopterus schreibersii</i> , <i>Tadarida pumila</i> , <i>Mops condylurus</i>	
<b>Bukalasa Bat Virus (BBV)</b>	Senegal, Uganda	<i>Chaerophon pumilus</i> , <i>Mops condylurus</i>	-
<b>Phnom Penh Bat Virus (PPBV)</b>	Malasia, Camboya	<i>Cynopterus brachyotis</i> , <i>Eonycteris spelaea</i>	-
<b>Kyasanur Forest Disease Virus (KFDV)</b>	India	<i>Cynopterus sphinx</i> , <i>Rousettus leschenaultii</i> , <i>Pteropus giganteus</i> , <i>Rhinolophus rouxi</i>	✓

<b>Murray Valley encephalitis virus (MVEV)</b>	Australia	<i>Eptesicus pumilus, Pteropus gouldi, Pteropus scapulatus,</i>	✓
<b>Sokoluk Virus (SOKV) Subtipo de EBV</b>	Rusia, Kirguistán	<i>Vespertilio pipistrellus,</i>	-
<b>Bussuquara virus (BSQV)</b>	Granada	<i>Artibeus jamaicensis</i>	
<b>Carey Island Virus (CIV)</b>	Malasia	<i>Cynopterus braciotis, Macroglossus minimus lagochilus.</i>	-
<b>Batu Cave Virus (BCV) Subtipo de PPBV</b>	Malasia	<i>Cynopterus brachyotis, Eonycteris spelaea</i>	-
<b>Yokose Virus (YOKV)</b>	Japón	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	-
<b>Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV)</b>	EE. UU., Guatemala, México, Trinidad	<i>Tadarida brasiliensis, Artibeus intermedius, Artibeus jamaicensis, Artibeus literatus, Artibeus phaeotis, Glossophaga soricina, Molossus major, Phyllostomus hastatus, Sturnira lilium, Eptesicus fuscus, Myotis lucifugus, Molossus ater, Anoura geoffroyi, Carollia perspicillata, Molossus molossus, Natalus tumidirostris, Pteronotus davyi, Pteronotus parnellii</i>	✓
<b>Tamana Bat Virus (TABV)</b>	Trinidad	<i>Pteronotus parnellii</i>	✓

<b>West Nile Virus (WNV)</b>	México, India, Etiopía, Israel, EE. UU.	<i>Eptesicus fuscus, Myotis lucifugus, Myotis septentrionalis, Eidolon helvum, Epomophorus minor, Pteropus scapulatus, Mops condylurus, Glossophaga soricina, Tadarida pumila, Rousettus leschenaultia, Rousettus aegyptiacus, Artibeus jamaicensis, Artibeus literatus</i>	✓
<b>Japanese encephalitis virus (JEV)</b>	India, Japón, Bengala,	<i>Rousettus leschenaultia, Taphozous melanopogon, Miniopterus fuliginosus, Myotis macrodactylus, Miniopterus shreibersii, Eptesicus fuscus, Pteropus alecto, Pteropus goldii, Pteropus scapulatus, Pteropus giganteus, Murina leucogaster, Megaderma lyra, Cynopterus sphinx, Myotis mystacinus, Pipistrellus abramus, Plecotus auritus, Rhinolophus ferrumequinum, Vespertilio superans, Hipposideros armiger, Hipposideros pomona, Hipposideros speoris, Hipposideros bicolor, Hipposideros cineraceus, Rhinolophus cornutus, Rhinolophus rouxi, Miniopterus schreibersii, Pipistrellus abramus, Rhinolophus macrotus</i>	✓
<b>Zika Virus (ZIKV)</b>	México, África del Este, Indonesia	<i>Desmodus rotundus, Eidolon helvum, Rousettus aegyptiacus, Rousettus angolensis, Mops condylurus, Tadarida pumila</i>	✓
<b>Yellow fever virus (YFV)</b>	EE. UU., Etiopía, Uganda, África del Este, México, Trinidad	<i>Eidolon helvum, Rousettus aegyptiacus, Phyllostomus hastatus, Artibeus cinereus, Artibeus jamaicensis, Artibeus literatus, Carollia perspicillata, Glossophaga soricina,</i>	✓

		<i>Molossus ater,</i> <i>Eptesicus fuscus</i> <i>Molossus molossus,</i> <i>Phyllostomus hastatus,</i> <i>Pteronotus davyi,</i> <i>Pteronotus parnellii,</i> <i>Vampyrops helleri,</i> <i>Mops condylurus,</i> <i>Tadarida pumila,</i> <i>Epomophorus sp.,</i> <i>Rousettus aegyptiacus,</i> <i>Myotis lucifugus</i>
<b>Dengue Virus (DENV)</b>	México, Australia, India, Trinidad y Tobago, China, Ecuador, Costa Rica, Guyana francesa, Uganda, Granada, Singapur, Colombia	<i>Desmodus rotundus</i> <i>Artibeus jamaicensis</i> <i>Carollia brevicauda</i> <i>Myotis nigrican,</i> <i>Pteropus scapulatus,</i> <i>Pteropus goudi,</i> <i>Cynopterus sphinx,</i> <i>Anoura geoffroyi,</i> <i>Artibeus cinereus,</i> <i>Artibeus jamaicensis,</i> <i>Artibeus lituratus,</i> <i>Carollia perspicillata,</i> <i>Molossus ater,</i> <i>Molossus molossus,</i> <i>Phyllostomus hastatus,</i> <i>Pteronotus davyi,</i> <i>Pteronotus parnelli,</i> <i>Sturnira spp.,</i> <i>Uroderma spp.,</i> <i>Artibeus planirostris,</i> <i>Natalus stramineus,</i> <i>Glossophaga soricina,</i> <i>Eumops glaucinus,</i> <i>Rhogeessa bickhami,</i> <i>Molossus pretiosus,</i> <i>Molossus rufus</i> <i>Molossus sinaloae,</i> <i>Chaerophon pumilus,</i> <i>Mops condylurus,</i> <i>Nycteris macrotis,</i> <i>Epomophorus labiatus,</i> <i>Eonycteris spelaea,</i> <i>Cynopterus brachyotis,</i> <i>Phyllostomus discolor</i>
<b>Ilheus virus (ILHV)</b>	Trinidad y Tobago	<i>Desmodus rotundus,</i> <i>Anoura geoffroyi,</i> <i>Molossus ater,</i> <i>Pteronotus davyi,</i> <i>Artibeus jamaicensis,</i> <i>Phyllostomus hastatus,</i>

## 2.8. Virus Dengue (DENV)

El dengue, también conocido como fiebre quebrantahuesos, es una infección viral causada por cualquiera de los 4 serotipos del virus Dengue, transmitida por mosquitos hembra del género *Aedes* a humanos, es endémica de regiones tropicales y algunas regiones subtropicales. Se trata de la arbovirosis con mayor prevalencia a nivel mundial (SSA, 2015; Pando-Robles *et al.*, 2021; OMS, 2024), presentando una transmisión cíclica en la que cada 3 a 5 años se presentan epidemias. (OMS, 2023). Posee un serio impacto en los ámbitos económicos y sociales, la cual representa un grave problema para la salud pública internacional, principalmente en regiones tropicales como América latina (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

Se sugiere que el origen del flavivirus progenitor común de DENV selvático, sus 4 serotipos, y otros virus relacionados surgió en África y Asia hace unos 1000 años y surgió a partir de ciclos donde se involucraron primates no humanos y mosquitos silvestres, mismo que posteriormente se diversificó en los 4 géneros pertenecientes a la familia Flaviviridae (Messina *et al.*, 2014; Harapan *et al.*, 2020; Marugesan & Manoharan, 2020). Posiblemente la transmisión en las poblaciones de humanos se estableció de manera independiente por serotipo recientemente hace unos pocos cientos de años (Harapan *et al.*, 2020).

En ciertas áreas geográficas un linaje o genotipo puede permanecer prevalente durante algunos años, para posteriormente extinguirse y ser reemplazado por otro nuevo. Este reemplazo podría ser causado mediante un proceso estocástico o generarse a causa de las variaciones de la eficiencia del DENV establecido (Sinha *et al.*, 2024).

DENV fue aislado por primera vez por Hotta y Kimura (1943), en Japón, a partir de la inoculación de suero de un humano infectado en el cerebro de ratones lactantes. Posteriormente, durante 1944, Sabin y Schlesinger aislaron DENV a partir de muestras de militares estadounidenses presentes en Hawái, India y Nueva Guinea; algunas variantes

aisladas de DENV mostraron una alta similitud entre ellas, pero eran antigenicamente distintas entre sí determinando los serotipos 1 y 2 de DENV (Marugesan & Manoharan, 2020; Roy & Bhattacharjee, 2021).

En el año de 1953 el serotipo de DENV-3 fue reportado por primera vez en Filipinas y Tailandia, y han existido reportes de su presencia periódicamente en el continente asiático. En América el primer reporte se realizó en Puerto Rico en 1963, donde se siguió reportando su presencia hasta 1978; sin embargo, en la mayoría de los países de América se reportó por vez primera hasta finales de la década de los años 80 e inicios de los años 2000 (Messina *et al.*, 2014). Durante el año 2023 fue de los principales serotipos reportados en México y Centro América. Y se reporta su circulación conjunta con los otros 3 serotipos hasta inicios de 2024 (Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud [OPS/OMS], 2024; OPS/OMS, 2025).

Por su parte el serotipo de DENV-4 también fue reportado durante el año 1953 en Tailandia y Filipinas. En el continente americano fue reportado hasta la década de 1980, y desde entonces su presencia ha sido reportada año con año en la región (Messina *et al.*, 2014).

Este virus posee un patrón de ocurrencia congruente con las estaciones del año, en las que una gran mayoría de infecciones generadas durante la primer mitad del año se generan en el hemisferio sur, mientras que la segunda mitad del año se generan en el hemisferio norte (OPS, 2024).

El ciclo de transmisión más conocido del DENV involucra un ciclo selvático (enzoótico) en el que primates no humanos susceptibles sirven como reservorio en entornos silvestres; y un ciclo urbano (endémico), en el que los humanos fungen como reservorio en entornos urbanizados; sin embargo, varios estudios sugieren que otros animales podrían estar involucrados en ambos ciclos fungiendo como potenciales hospedadores secundarios, mismos que debido a cambios antropogénicos aumentan la frecuencia de contacto con las poblaciones humanas (Gwee *et al.*, 2021).

Estos ciclos selváticos en los que participan primates no humanos han sido evidenciados en Asia y en África; sin embargo, no existe suficiente evidencia del rol que

juegan las especies animales dentro del ciclo selvático en el continente americano (Valentine *et al.*, 2019).

Las principales especies de mosquitos que fungen como vectores de DENV son mosquitos de hábitos peridomésticos del género *Aedes*, principalmente de la especie *Aedes aegypti*, así como en menor medida otras especies tales como: *A. albopictus*, *A. polynesiensis*, *A. scutellaris* y *A. vittatus*, este último ha sido reportado recientemente en América (Nanaware *et al.*, 2021; Bonilla-Aldana *et al.*, 2024). Estas especies de mosquitos poseen la capacidad de sobrevivir en entornos urbanos, completando sus ciclos biológicos en contenedores con agua estancada. Posee hábitos diurnos y los periodos de alimentación se llevan a cabo principalmente en la mañana y previo al anochecer. El ciclo biológico de los mosquitos tiene una duración aproximada de 10 días dependiendo de factores ambientales y comprende 4 estadios que son huevo, larva, pupa y adulto (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

*A. aegypti* posee afinidad por los hábitos peridomiciliarios, asociado muy cercanamente con asentamientos urbanos. Las larvas suelen ser encontradas en objetos que podrían fungir como recipientes o contenedores no naturales con agua estancada tales como macetas, cubetas, llantas y estanques; sin embargo, algunas otras especies de mosquitos silvestres son asociadas a los ciclos selváticos que suelen involucrar primates no humanos (Holmes & Twiddy, 2003).

La transmisión de DENV se lleva a cabo durante los periodos de alimentación de los mosquitos hembra, mismas que inoculan saliva con partículas virales infectivas hacia el torrente sanguíneo del humano del cual se alimenta. Por su parte, los humanos infectados son capaces de transmitir la infección a los mosquitos que consumen su sangre durante 4 a 5 días posteriores al inicio de la presentación de los síntomas, una vez que el mosquito se ha infectado es capaz de transmitir el virus durante toda su vida (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

Entre los factores de riesgo para contraer la infección están: habitar en regiones geográficas donde la enfermedad es endémica, la presencia del vector y que existan condiciones de higiene deficiente como lo es la dificultad del acceso al agua potable (Secretaría de Salud, 2015). En cuanto a los factores para desarrollar un cuadro de DG se encuentran: antecedentes de una infección previa por DENV, la presencia de serotipos

altamente virulentos y la cocirculación de estos; así como la respuesta inmune del individuo infectado (Secretaría de Salud, 2015).

Existen otros factores que influyen en la diseminación del vector, y por lo tanto de la enfermedad en áreas geográficas en la que previamente no se distribuían, tales como: la situación demográfica, el ambiente, la urbanización, la cultura, los movimientos migratorios, las condiciones de vivienda, la capacidad y eficiencia de los servicios de salud; así como el cambio climático, que genera el incremento de temperatura favoreciendo el desarrollo del vector debido a su naturaleza poiquiloterma (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

#### 2.8.1. Agente etiológico

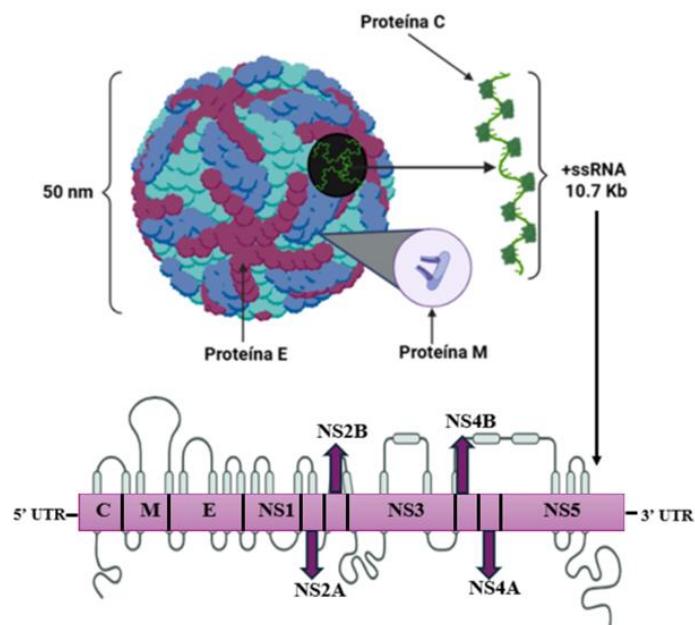
Se trata de un virus perteneciente al género *Orthoflavivirus*, especie *Orthoflavivirus denguei* (Simmonds *et al.*, 2017) del cual se conocen 4 serotipos: DENV 1, 2, 3 y 4 (Gwee *et al.*, 2021), mismos que contienen variaciones considerables en su genoma, por lo que se conocen una variedad de genotipos definidos filogenéticamente pertenecientes a cada uno de los 4 serotipos (Holmes & Twiddy, 2003). Cada serotipo se divide en diferentes genotipos de acuerdo con la distribución geográfica y potencial epidémico: DENV-1 se divide en 5 genotipos, por su parte DENV-2 se divide en 6 genotipos; DENV-3 posee 5 genotipos y DENV-4 también consiste en 5 genotipos (Poltep *et al.*, 2021).

Los viriones de DENV, tienen una morfología esferoidal y poseen dos conformaciones, el virión inmaduro cuyo tamaño es de aproximadamente 60 nm, mismo que tiene una superficie irregular; y el virión maduro, cuyo tamaño oscila alrededor de los 50 nm con una superficie lisa (Harapan *et al.*, 2020). Contienen una molécula monocatenaria de ARN en sentido positivo como genoma, el cual está comprendido por 10.7 Kb (Simmonds *et al.*, 2017), con una nucleocápside icosaédrica y cubierto de una capa lipídica proveniente de la membrana de la célula infectada (Nanaware *et al.*, 2021). Se ha demostrado que el genoma de DENV posee una escasa fidelidad de traducción y mantiene una alta frecuencia de mutaciones (Harapan *et al.*, 2020).

El genoma de DENV posee UTRs en ambos extremos, flanqueando un único ORF (Harapen *et al.*, 2020; Nanaware *et al.*, 2021), los cuales son esenciales para la eficiencia de

la traducción y replicación del genoma (Liu *et al.*, 2023). La cap tipo I presente en el extremo 5' del genoma ( $m7GpppAmG$ ), sirve como sitio de iniciación para la traducción, por su parte el extremo 3' carece de cola de poliadeninas imitando una molécula ARN celular y en su lugar forma una estructura en bucle denominada *stem-loop* (SL) (Nanaware *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023).

El UTR 5' posee cerca de 95 a 101 nucleótidos, donde se encuentran 2 *stem-loops*, SLA y SLB, regiones río arriba y río abajo relacionadas a metionina denominadas 5'UAR y 5'DAR respectivamente; un C coding hairpin (cHP) y secuencias de ciclación 5'CS, estas últimas tres se encuentran en el fragmento codificante para la proteína C (Nanaware *et al.*, 2021).



**Figura 7.** Virión maduro de DENV y localización en el genoma de las proteínas estructurales y no estructurales

Por su parte el tamaño de UTR 3' es distinto entre los 4 serotipos (Nanaware *et al.*, 2021), se encuentra dividida en tres dominios con estructuras secundarias conservadas, cada dominio contiene elementos importantes involucrados en la replicación. El primer dominio contiene entre 100 a 200 nucleótidos dependiendo del serotipo en cuestión. En los serotipos 1, 2 y 3 se encuentran presentes dos estructuras conservadas denominadas xrRNA o RNAs resistentes a la enzima exorribonucleasa 5'-3' (Xrn1), los cuales presentan resistencia a la

degradación por dicha enzima y son los responsables de la formación del ARN subgenómico (Liu *et al.*, 2023).

El segundo dominio posee un conjunto de secuencias variables, y a continuación, presenta dos estructuras secundarias conservadas en los 4 serotipos, mismas que tienen forma de mancuerna (dumbell structure) denominadas DB1 y DB2 que contienen la secuencia conservada 2 (CS2) y la secuencia conservada repetida 2 (RCS2) (Nanaware *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023); y finalmente el dominio 3, es el más conservado entre los 4 serotipos, con un tamaño aproximado de 100 nucleótidos, contiene las secuencias conservadas (CS1), una estructura corta en horquilla, y la estructura SL, mismas que poseen un papel crucial en la replicación viral (Nanaware *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023).

Como se ha mencionado, DENV es capaz de generar copias de RNA subgenómicos durante su proceso de replicación conocidos como ARN flaviviral subgenómico (sfRNA) y es clasificado como ARN no codificador. El sfRNA se genera como producto de la degradación del ARN viral, proceso provocado por la enzima 5'-3' exorribonucleasa propia del hospedador. Estos sfRNA, al interactuar con las proteínas del hospedador y del propio virus, tienen como repercusión la mejoría de la eficiencia de DENV durante su replicación y transmisión; así con la evasión de la respuesta antiviral promoviendo la patogenicidad de este (Liu *et al.*, 2023).

El ORF codifica una poliproteína que es precursora de 10 proteínas maduras, tres con funciones estructurales como la encapsidación, la formación de la nucleocápside y maduración del virión, entre otras, denominadas: C, E y prM/M; así como 7 proteínas no estructurales, principalmente con funciones enzimáticas, las cuales se denominan: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Nanaware *et al.*, 2021).

## 2.8.2. Proteínas estructurales.

### Proteína C

Se trata de una proteína homodimérica de 12 kDa con aproximadamente 100 aminoácidos, posee cuatro estructuras  $\alpha$ -helicoidales y un dominio N-terminal

intrínsecamente desordenado. Está involucrada en la formación de la nucleocápside y la encapsidación del genoma durante las fases tempranas del ensamblaje de los viriones (Harapan *et al.*, 2020).

### Proteína M

El precursor de la proteína prM posee 166 aminoácidos, que juega un papel crucial durante la maduración de los viriones. Esta proteína permanece unida al virión para prevenir que este se fusione prematuramente a la membrana de la célula hospedadora, además es capaz de interactuar con las ATPasas vacuolares para favorecer el medio propicio para la movilización y secreción viral (Duan *et al.* 2008; Yu *et al.*, 2009; Nanaware *et al.*, 2021).

Por su parte la proteína M madura consiste en 75 aminoácidos, esta juega un papel importante en el ordenamiento y maduración de los viriones, también funge como una estructura tipo cap que previene que la proteína E se fusione de manera prematura antes de la liberación del virión al exterior de la célula (Harapan *et al.*, 2020).

### Proteína E

La proteína E se trata de una proteína dimérica de fusión de membrana de clase II con aproximadamente 53 kDa, y 495 aminoácidos. En el virión maduro, se encuentran 90 homodímeros en confirmación plana sobre la superficie de la partícula viral, formando una cobertura proteica lisa. Cada uno de los monómeros se compone de 3 dominios denominados I, II y III (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

Por medio del dominio III, la proteína E se encarga de la unión y fusión del virión a la membrana celular de la futura célula hospedante, así mismo resulta determinante para establecer el rango de hospedadores, tropismo y virulencia (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

#### 2.8.3. Proteínas no estructurales

## NS1

Se trata de una proteína no estructural con un peso molecular de 45 kDa, que se encuentra involucrada en el complejo de replicación del ARN. Esta es procesada como monómero en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, posteriormente es secretado como un hexámero lipoproteico hacia el espacio extracelular y el torrente sanguíneo (Harapan *et al.*, 2020).

La proteína NS1 también posee intervención en los complejos replicativos y en las defensas del virus ante el sistema inmune del hospedante, inhibiendo la activación del sistema del complemento (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

La proteína no estructural NS1, posee una variedad de funciones tanto intracelular como de manera extracelular. Esta proteína juega un papel importante en la fisiopatología del dengue grave. Recientemente se han realizado hallazgos que sugieren su participación en la disrupción endotelial, provocando la extravasación de plasma mediante la activación de macrófagos a través de la vía de TLR-4, resultando en la liberación de citocinas (Sinha *et al.*, 2024).

NS1, ha sido usada como marcador diagnóstico temprano para pruebas inmunocromatográficas y de inmunoadsorción ligada a enzimas, para la determinación de la severidad y el nivel de la infección por DENV (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

## NS2A y NS2B

La proteína NS2A, se trata de una proteína de aproximadamente 22 kDa, que posee actividad involucrada en los complejos replicativos de DENV, además está relacionada con la coordinación entre el empaquetamiento de RNA y la replicación, así como de antagonismo contra interferones del hospedante. (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024). Por su parte, NS2B, que es una proteína asociada a la membrana, posee un peso molecular de 14 kDa y sirve como cofactor para la actividad de serín proteasa de NS3 (Harapan *et al.*, 2020).

### NS3

La proteína no estructural 3, posee diferentes funciones como la presencia de la actividad de serín proteasa similar a quimotripsina, ARN trifosfatasa, NTPasa y helicasa (Harapan *et al.*, 2020). NS3 se asocia con NS2B para llevar a cabo la formación del complejo proteolítico, esta es usada por NS3 como cofactor para llevar a cabo la escisión de sitios específicos de la poliproteína viral, haciendo más eficiente el proceso replicativo (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

### NS4

Las proteínas no estructurales denominadas NS4A y NS4B con pesos moleculares de 16 kDa y 27 kDa respectivamente, se trata de un par de proteínas integrales, mismas que inducen alteraciones de membrana que resultan relevantes para la replicación viral (Harapan *et al.*, 2020).

La proteína NS4A actúa durante la replicación viral induciendo la autofagia y previniendo la muerte celular, mecanismo que resulta beneficioso para los procesos replicativos de DENV (Sinha *et al.*, 2024). Mientras que la proteína NS4B interactúa con la proteína NS3 para realizar la formación de los complejos replicativos y modulando la infección viral asistiendo en el proceso de replicación y bloquear la señales de transducción inducidas por interferón (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

### NS5

NS5 se trata de una proteína no estructural de 104 kDa, misma que es la más conservada entre los *Orthoflavivirus*, teniendo actividad de polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp). También se encuentra involucrada en el capping del genoma por medio de su actividad metiltransferas y guanidiltransferasa. Esta proteína se encuentra predominantemente al interior del núcleo de las células infectadas por DENV y se especula que posee la capacidad de suprimir la respuesta antiviral (Perera & Kuhn, 2008; Sinha *et al.*, 2024).

#### 2.8.4. Ciclo biológico de DENV

Inicialmente, un mosquito hembra del género *Aedes*, puede infectarse con DENV por vía transovárica (Lee & Rohani, 2005) o a partir de alimentarse de un humano previamente infectado. Una vez que el mosquito hembra se infecta, los viriones de DENV infectan a su vez el intestino medio para posteriormente infectar otros tejidos, entre ellos las glándulas salivares (Sinha *et al.*, 2024).

La infección por DENV en el humano comienza cuando la hembra infectada de alguna de las especies previamente mencionadas de mosquitos del género *Aedes*, pica a un humano para alimentarse de su sangre, esta posee viriones infectivos en la saliva, misma que inocula en el tejido del humano del cual se alimenta (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

DENV es capaz de utilizar una amplia variedad de moléculas para unirse e infectar diversas células como lo son células epiteliales, fibroblastos, monocitos macrófagos, células dendríticas, células B, células T, células del endotelio y hepatocitos. Se han identificado diferentes receptores en células de mamíferos, entre los más estudiados son: receptores de manosa presentes en monocitos y macrófagos, heparán sulfato, las familias de proteínas transmembranales TIM y TAM presentes en varias líneas celulares inmunitarias, las lectinas de tipo C conocidas como DC-SIGN expresadas en células dendríticas y los receptores de Fcγ (Nanaware *et al.*, 2021; Roy & Bhattacharjee, 2021), así como glucosaminoglicanos, proteínas de choque térmico, moléculas de CD14 y neolactotetrasylceramida, entre otra moléculas que se encuentran en estudio (Harapan *et al.*, 2020).

El ciclo replicativo comienza con la unión de la proteína E con alguno de sus receptores en la superficie de la célula blanco. La ruta más común y estudiada de entrada a la célula por parte de los viriones de DENV se trata de la endocitosis mediada por clatrininas; sin embargo, se han descrito otras rutas alternativas a esta como macropinocitosis, fagocitosis, balsas lipídicas y caveolas (Nanaware *et al.*, 2021).

Los viriones utilizan las fosas cubiertas por clatrininas presentes en la superficie de la célula blanco, formándose una vacuola en la cual son endocitados. Posteriormente las

moléculas de clatrina se liberan de la vacuola para dar paso al endosoma primario, llevando a un pH de 6.5, posteriormente el endosoma va madurando y acidificando su pH (Harapan *et al.*, 2020; Nanaware *et al.*, 2021), generando el reordenamiento de la proteína E, lo que provoca que se fusionen con la membrana del endosoma para desensamblar el virión y posteriormente liberar la nucleocápside al citoplasma posiblemente por medio de ubiquitinación (Nanaware *et al.*, 2021). Posteriormente el RNA viral se separa de la nucleocápside y es translocado mediante la maquinaria de transporte del citoesqueleto al retículo endoplásmico rugoso donde se llevará a cabo la replicación y traducción viral en las estructuras conocidas como complejos replicativos (Roy & Bhattacharjee, 2021; Sinha *et al.*, 2024).

Tanto los procesos de traducción de las proteínas virales, así como su maduración, generan cambios estructurales en la membrana del retículo endoplásmico denominados complejos replicativos, formados por membranas modificadas y paquetes de vesículas que conectan con el citoplasma por medio de poros que permiten el suministro de elementos necesarios para la replicación viral. Dichas vesículas contienen elementos enzimáticos virales como NS5 (RdRp), NS3 con propiedades enzimáticas de helicasa, 5'RNA-trifosfatasa (RTP) y nucleósido trifosfatasa (NTPasa), y otras proteínas no estructurales, además de otros elementos propios del hospedador que fungen como catalizadores para la replicación de RNA (Nanaware *et al.*, 2021).

La molécula de RNA, sirve como molde para la traducción de una única poliproteína, misma que será escindida por medio de las proteasas virales como NS3 y mediante señal peptidácea del hospedador (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024). Las hebras de RNA de sentido positivo pueden servir de manera directa como mRNA para la traducción de proteínas, para servir como templados para la replicación del genoma de DENV, o para ser encapsidadas por la proteína C para la posterior formación de nuevos viriones (Harapan *et al.*, 2020; Nanaware *et al.*, 2021).

El proceso de traducción comienza por medio del mecanismo de traducción dependiente de cap, en el que el factor eIF4E se une al cap en el extremo 5' de la molécula de RNA viral, posteriormente el complejo eIF4F mismo que está comprendido por eIF4E, la enzima con actividad helicasa eIF4A y su cofactor eIF4B, así como la proteína adaptadora

EIF4G se unen al cap y reclutan ribosomas para estimular y dar comienzo a la traducción. Si la disponibilidad de eIF4E no es suficiente, se pueden llevar a cabo mecanismo de traducción no dependientes de cap, como el denominado sitio de entrada al interior del ribosoma (IRES), en las que intervienen algunas secuencias presentes en el 5'UTR (Sinha *et al.*, 2024).

Por su parte el 3'UTR también puede estimular la traducción mediante procesos dependientes e independientes de cap usando la estructura de stem loop, la cual posee funciones análogas a la cola de poliA para el reclutamiento de factores de traducción (Sinha *et al.*, 2024).

La estructura SLA presente en el extremo 5'UTR, actúa a manera de promotor para la actividad de RdRp de la proteína no estructural NS5 cuya reubicación en el extremo 3' es facilitada por medio de la ciclación del genoma durante la iniciación de la síntesis de moléculas de RNA. El apareamiento de bases entre las secuencias complementarias presentes en los UAR de ambos extremos provoca el desenrollamiento del SL presente en 3' para permitir la replicación. El proceso de elongación de la molécula de RNA está mediado por NS5 al formar *de novo* un dinucleótido CU (Nanaware *et al.*, 2021).

Las hebras negativas se unen a las hebras molde positivas, formando una molécula intermediaria de dsRNA. Esta hebra negativa sirve como molde y la hebra positiva recién sintetizada sustituye a la anterior, por lo que la replicación se da de manera asimétrica, amplificando 10 veces más la cantidad de copias de hebras positivas en comparación con las hebras negativas (Nanaware *et al.*, 2021).

La encapsidación del genoma viral se lleva a cabo por medio de interacciones electrostáticas generadas por unión de las cargas positivas de la proteína C y las cargas negativas de la hebra de RNA, de esta interacción se genera la estructura denominada nucleocápside (Barnard *et al.*, 2021; Nanaware *et al.*, 2021). La hebra de ARN se une a NS2, misma que recluta a las poliproteínas C-prM-E y al cofactor NS2B-3 hacia el sitio de ensamblaje (Patkar & Kuhn, 2008; Xie *et al.*, 2019; Nanaware *et al.*, 2021). C y prM se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplásmico. La unión de C es escindida por NS3B con actividad serín proteasa lo que provoca la liberación de prM y la proteína C madura lista para unirse al ARN (Byk *et al.*, 2026; Barnard *et al.*, 2021; Nanaware *et al.*, 2021).

Entonces, las hebras de ARN recién sintetizadas y las proteínas estructurales son ensambladas en la membrana del retículo endoplásmico para formar un virión inmaduro con apariencia “espinosa” en sus superficie debido a la presencia de heterodímeros formados por prM-E, estos viriones inmaduros se transportan por medio de la vía secretoria a la red trans del aparato de Golgi (TGN) donde acontece la maduración de los viriones debido a la acidificación del medio, adquiriendo estos una apariencia lisa en su superficie ahora con heterodímeros de E. Durante este proceso mediado por furinas del hospedante, se lleva a cabo la separación del péptido pr de prM, quedando únicamente M en el virión como proteína transmembranal (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

El segmento pr continúa asociado con el virión hasta su liberación hacia el exterior celular, lo que evita la unión prematura de la proteína E con la membrana exosomal durante su paso por el TNG (Yu *et al.*, 2009; Nanaware *et al.*, 2021). Además, interactúa con ATPasas vacuolares, lo que favorece el mantenimiento de la vía secretora para el tráfico viral y del medio ácido propicio para la secreción de los viriones (Duan *et al.*, 2008; Nanaware *et al.*, 2021).

Finalmente, los viriones maduros que constan de una molécula de ARN de cadena simple con sentido positivo (+ssRNA), encapsidada en varias copias de la proteína C, rodeados una membrana lipídica en las cuales están insertadas 180 copias de las glucoproteínas transmembranales E y M (Nanaware *et al.*, 2021) son liberados del TNG y posteriormente pasan al citoplasma para ser exocitados junto con la proteína pr escindida, al espacio extracelular completando así el ciclo de infección (Harapan *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2024).

## 2.8.5. Signos y síntomas

La infección por DENV en la mayoría de los casos puede ser asintomática o leve y autolimitante, pero puede derivar también en estados potencialmente fatales como dengue grave, fiebre hemorrágica por dengue (DFH) y el síndrome de shock por dengue (DSS) (OhAinle *et al.*, 2011; Gwee *et al.*, 2021). Se reconocen cuatro fases de la enfermedad: el

periodo de incubación, la fase febril, fase crítica y fase de convalecencia (Secretaría de Salud, 2015).

Desde el año 2009, se utiliza la denominada “Clasificación revisada del dengue” para clasificar la severidad de los cuadros generados por la infección de DENV, y establece dos formas de la enfermedad: el dengue no grave (DNG) y el dengue grave (DG). En el primer caso, la enfermedad puede ocurrir sin complicaciones, pero también puede presentarse con signos de alarma (DCSA) lo que puede derivar en un cuadro severo, por lo que es de suma importancia el monitoreo de la evolución del individuo infectado para adoptar medidas para la prevención y terapéutica contra un posible cuadro de DG. (Secretaría de Salud, 2015; OPS, 2024).

Los síntomas de la enfermedad suelen comenzar del día 4 al 10 post infección y constan de fiebre mayor a 40°C, dolor retro orbital, cefalea, mialgias, artralgias, emesis, erupción macular o papulomacular y linfadenomegalia (OMS, 2024; SINAVE, 2024) así como signos leves de hemorragia tales como equimosis y petequias (OPS, 2024).

**Cuadro 5.** Resumen del cuadro clínico generado por la infección de DENV durante cada una de las 4 fases (OPS, 2024; SINAVE, 2024).

Periodos de la infección	Duración.	Características
<b>Incubación</b>	3-14 días	Picadura del mosquito infectado a un individuo susceptible.
<b>Fase febril</b>	3-7 días PI	Fiebre >38°C, cefalea, mialgia, artralgia, dolor retro orbital, emesis y erupciones. La mayoría de los pacientes únicamente cursa con este cuadro y se recuperan sin presentar complicación alguna.
<b>Signos de alarma.</b>	Final de la fase febril	Hemorragia en mucosas, dolor abdominal y emesis persistentes, letargo, ascitis, derrame pleural o hidropericardio; disnea, hepatomegalia y aumento de los valores del hematocrito.

<b>Fase crítica</b>	3-7 días del inicio de la fase febril. 24-48 h posteriores al cese de la fase febril	Extravasación, ascitis, derrame pleural, hipoproteinemia, hipotensión, hematemesis, melena, shock, miocarditis y elevación de AST y ALT.
<b>Fase de convalecencia</b>	7-10 días posteriores al inicio de la fase febril. 18-72 h posteriores a la fase crítica	Mejoría en la hemodinámica, reabsorción de líquidos extravasados y diuresis.

La infección por uno de los 4 serotipos de DENV brinda inmunidad de por vida contra el serotipo causante de la infección, así como inmunidad temporal contra un dengue severo causado por otro serotipo; sin embargo, una vez finalizado este periodo de inmunidad, el paciente presentará mayor riesgo de enfermedad grave al ser infectado por diferente serotipo, fenómeno denominado *enhancement* o amplificación dependiente de anticuerpos (ADE) (OhAinle *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2024).

Dicho fenómeno podría resultar amplificación dependiente de anticuerpos, el cual consiste en la presencia de concentraciones subneutralizantes de anticuerpos dirigidos contra algún serotipo causante de una infección previa, dan como respuesta un aumento de la replicación viral en células mieloides portadoras de receptor Fc $\gamma$ R o de respuestas dañinas provenientes de células T (Oh Ainle *et al.*, 2011).

## 2.8.6. Epidemiología

La incidencia del dengue a nivel mundial ha sufrido una alza considerable durante los últimos 20 años, donde los casos se han disparado de 500, 000 a 5.2 millones, del año 2000 al 2019. En este último año se registró una alza moderada de casos en 129 países (WHO, 2023), principalmente situados en Norte y Sudamérica, así como en el Sureste asiático. Se estima que cerca de dos quintos de la población mundial se encuentran en riesgo de contraer

DENV, lo que deriva en aproximadamente 400 millones de infecciones y cerca de 20,000 muertes por año (Liu *et al.*, 2023).

Desde 2023 se registró un aumento de muertes debido a múltiples brotes y un repunte histórico de casos desde 1980, incluso en zonas en las que anteriormente no se habían registrado casos de dengue, incluyendo 5 regiones: América, África, Sureste Asiático, Pacífico de Occidente y Mediterráneo de Oriente, y un total de 80 países. Únicamente en la Región de las Américas se contabilizan cerca del 80% de casos (4.1 millones de contagios); sin embargo, es altamente probable que las cifras no representan la realidad, debido a que no todas las personas que contraen la infección enferman, y por tanto se omite la notificación de estos casos, además de que en algunos países no es una enfermedad de notificación obligatorio (OMS, 2023) así en México, donde el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) establece la notificación obligatoria de todos los casos probables de DENV en el territorio mexicano (SINAVE, 2024).

Durante marzo de 2023 la OMS realizó un comunicado sobre la expansión de los casos en número y área geográfica, y para finales de dicho año, el 5 de diciembre, emitió junto con la OPS una alerta epidemiológica por el aumento de casos en la subregión del istmo de Centroamérica y México, principalmente provocados por DENV-3, mismo que no había circulado en ciertas zonas de la región durante algunos años. A inicios del año 2024 se reportó la circulación de los 4 serotipos en América y concretamente en México (OPS/OMS, 2024).

Fue en 2023, donde se ha registrado el mayor número de casos de enfermedad por DENV en América, con 4.565.911 casos reportados, de los cuales 7.653 han sido casos de dengue grave y un total de 2,340 decesos. Del total de casos de 2023, México tuvo el 14% de todos los casos acumulados, con una letalidad de 0.063%. Así mismo durante 2023 se registraron brotes en 23 países con un número mayor de casos esperados entre ellos Argentina, Brasil y México (OPS/OMS, 2024).

En 2024 se reportaron más de 13.027.747 millones de casos, casi triplicando las cifras del año 2023. De dichos casos, 22,684 se han tratado de casos de DG, con un total de 8,186 muertes. Lo que significa un incremento de 190% contrastando con el mismo periodo de 2023, y 366% comparado con el promedio del último lustro. Los países en los que se

concentraron el 90% de los casos y el 88% de las muertes son Brasil, Argentina, Colombia y México (OPS/OMS, 2025).

En México durante 2024, se registraron un total de 558.846 casos. (OPS/OMS, 2025). Durante las primeras 5 semanas epidemiológicas de 2024 fue registrado el aumento en un 368% con respecto al mismo periodo en 2023, con casos principalmente reportados en los estados de Quintana Roo, Guerrero y Tabasco (OPS/OMS, 2024). Hasta inicios de 2025 continúa el reporte de la cocirculación de los 4 serotipos de DENV en México, incluyendo DENV-3 (OPS/OMS, 2025), cuyo material genético ha sido detectado en el hígado de varios ejemplares de *D. rotundus* del presente estudio.

El serotipo 3 de DENV se divide en cinco genotipos, denominados subtipos I, II, III, IV y V. Cada uno de estos subtipos posee un área geográfica determinada, en la cual los virus pertenecientes al subtipo I son provenientes de Malasia, Indonesia, Filipinas y algunas islas del Pacífico Sur. El subtipo II son virus provenientes de Tailandia. En el subtipo III se encuentran virus de Sri Lanka, India, Samoa y el continente africano; y finalmente, los virus del subtipo IV son provenientes de Puerto Rico y de Tahití (Lanciotti *et al.*, 1994; OMS/OPS, 2025).

Se reconoce que el genotipo más extendido es el GIII, y ha estado presente en brotes de importancia presentes en Asia, África y América, este tiene su origen en el sur de Asia alrededor de 1970 y su introducción en América se llevó a cabo en los años noventa estableciendo un linaje endémico propio de las Américas denominado GIII-American-I el cual estuvo circulando durante cerca de 20 años, hasta 2023 donde se detectó una reintroducción en Brasil el cual se identificó como GIII-American-II. Se hipotetiza que fue introducido de India al Caribe durante 2018-2019 diseminándose por todo centro y Suramérica durante 2022 y 2023 (OMS/OPS, 2025).

Durante el año de 1994 DENV-3 fue reintroducido en el continente americano, en Nicaragua y Panamá, después de no haber sido reportado desde 1977 y 1978. DENV-3 se extendió por Centroamérica y México; y posteriormente a varias islas del Caribe y Sudamérica. Durante el año 2000 en Brasil ocurrió un brote de DENV-3 de gran importancia con duración de 3 años y fue vinculado a los casos de muertes, cocirculando con DENV-1 y

DENV-2, posteriormente durante todo el año 2000 fue diseminándose por todo el continente americano (OPS/OMS, 2025).

En México DENV-3 fue reportado en el periodo comprendido entre los años 1995 a 2008, especialmente durante el año de 1997 en que alcanzó un pico, representando el 88% de positividad del total de muestras sometidas a serotipificación. Posteriormente el serotipo 3 fue a la baja, durante el periodo de 2009 a 2001, con valores bajos cada año de 0.1% a 6% del total de muestras. Para el año 2022 se observó un aumento considerable en la circulación de DENV-3 frente al resto de serotipos, teniendo porcentajes de 25%, de 59% en 2023 y en el año 2024, un 86% (OMS/OPS, 2025).

Con respecto a los estados en los que se llevaron a cabo los muestreos, a la semana epidemiológica 52, del año 2023, se contabilizaron un total de 2,589 casos de dengue en el estado de Tabasco, un total de 96 casos en Querétaro y 631 casos en el estado de Hidalgo. Por su parte en la semana epidemiológica número 52 del año 2024 se contabilizaron 3,592 casos en Tabasco, 2,847 en Querétaro y 1,870 en Hidalgo (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología/ Secretaría de Salud [SINAVE/DGE/SALUD], 2025).

La semana epidemiológica número 52 de 2024 también revela que, en Querétaro, concretamente en Jalpan de Serra, el serotipo más prevalente fue DENV-3, siendo este el tercer municipio con mayor cantidad de casos en el estado. En el estado de Hidalgo, la mayor circulación fue del serotipo 3; sin embargo, la mayor parte de casos se centraron en municipios del norte del estado, alejados de Progreso de Obregón. Con respecto a Tabasco, el serotipo de mayor circulación fue el 3, y los municipios con mayor cantidad de casos fueron Nacajuca, Jalapa, Centro y Teapa de los cuales estos tres últimos rodean el municipio de Tacotalpa en el que se encuentra Poaná (SINAVE/DGE/SALUD, 2025).

Las repercusiones del resurgimiento de un serotipo ausente en la región durante 10 años y ante el cual la población es altamente susceptible y carente de inmunidad, aumentan la probabilidad de la aparición de brotes y casos de dengue grave que eventualmente podrían saturar el sistema sanitario (SINAVE/DGE/SALUD, 2025).

### 2.8.7. Tratamientos y vacunas.

No se cuenta con modelos animales adecuados para el estudio y desarrollo de terapias farmacológicas contra la enfermedad causada por DENV (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024), por lo que actualmente no existe un tratamiento antiviral específico para las infecciones por dengue, por lo que la terapia es de soporte y se centra en el control de la fiebre y el dolor, evitando el uso de AINES que pudieran agravar la posibilidad de hemorragias, y el uso adecuado de fluidoterapia (Gwee *et al.*, 2021; OMS, 2024). En los casos leves de la enfermedad, el paciente puede continuar con tratamiento domiciliario; sin embargo, en los casos de donde se presentan signos de alarma o se presentan las formas graves de la enfermedad, se requiere tratamiento intrahospitalario (OMS, 2024).

Actualmente la generación de vacunas contra DENV sigue en curso; sin embargo, los fenómenos como la cocirculación de dos o más serotipos o la amplificación dependiente de anticuerpos, dificultan el avance de dicho proceso (Nanaware *et al.* 2021; Sinha *et al.*, 2024). Las eficacia de las vacunas difiere entre individuos, dependiendo de varios factores como el grupo etario, el estatus serológico e inmunológico del individuo, así como del serotipo en cuestión. De manera general no se recomienda la vacunación en individuos seronegativos, que no han estado expuestos a DENV anteriormente (Sinha *et al.*, 2024).

### 2.8.8. Diagnóstico

El diagnóstico inicial para DENV debe realizarse mediante la historia clínica, signos y síntomas del paciente, así como la situación epidemiológica en la que se desenvuelve, lo que conduce al uso de protocolos de confirmación realizados mediante pruebas de laboratorio. La OMS y la OPS recomiendan el uso de RT-PCR para la detección de ácidos nucleicos; ELISA para la detección de antígenos como la proteína no estructural NS1, y de anticuerpos IgM; además de aislamiento y cultivo viral (OPS/OMS, 2024).

Se recomienda principalmente el uso de aislamiento y detección de ácidos nucleicos o de las proteínas virales, los cuales deberían realizarse durante los primeros 5 días posteriores al inicio de la fase aguda, en muestras de suero. Por su parte, OMS y OPS no

recomiendan el uso de pruebas inmunocromatográficas y el uso de ensayos serológicos no es muy recomendado debido a que únicamente indicaría contacto con el virus, además de la probabilidad de reacción cruzada con otros flavivirus circulantes; sin embargo, se recomienda el uso de detección de anticuerpos IgM en paralelo con ensayos de PRNT para poder evidenciar la seroconversión y el aumento del título de anticuerpos (OPS/OMS, 2024).

En casos donde el paciente ha fallecido, se recomienda el uso de muestras provenientes de los riñones, bazo e hígado para realizar detección de DENV por medio de RT-PCR, así como para estudios de inmunohistoquímica e histopatologías (OPS/OMS, 2024).

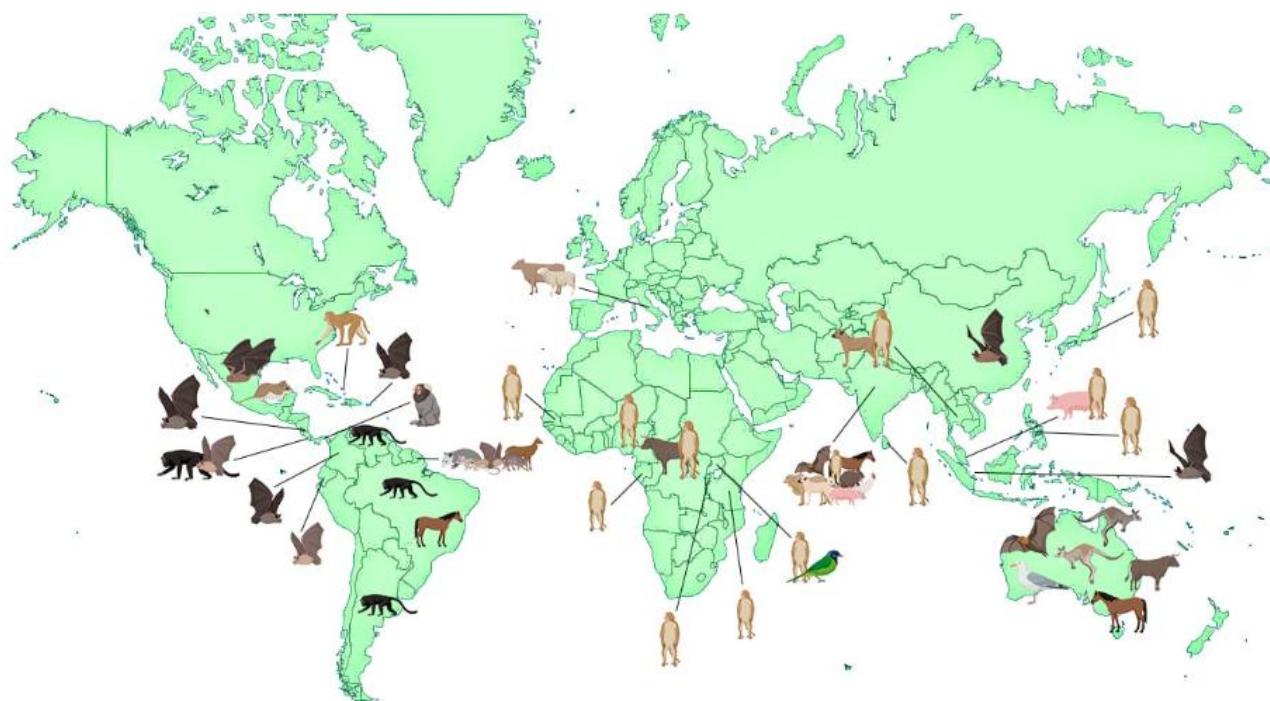
#### 2.8.9. DENV en animales

Los humanos son los principales reservorios durante los ciclos epidémicos urbanos de dengue y se conoce que algunos animales participan como reservorios de algunos flavivirus transmitidos por mosquitos del género *Aedes* como YFV y ZIKV; sin embargo, aún no se tiene evidencia clara sobre su participación dentro del ciclo urbano de DENV (Gwee *et al.*, 2021). Además del ciclo urbano, ocurre también el ciclo selvático, en el cual podrían existir otros vectores distintos a los mosquitos *Aedes* y en el que especies de animales podrían fungir papeles importantes dentro del mismo (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

Debido a la ausencia de presentación clínica en animales infectados con DENV de forma natural o experimental, no existe un modelo animal adecuado para el estudio del curso, la patogenia de la enfermedad o posible tratamiento (Bonilla-Aldana *et al.*, 2024); sin embargo, se han usado algunos modelos animales con ciertas limitantes, para estudios sobre susceptibilidad a la infección, vacunas y fármacos y sobre la inmunopatogénesis de la infección tales como algunos primates no humanos, ratones (Zompi & Harris, 2012) y algunas especies de murciélagos (Perea-Martínez *et al.*, 2012).

Los primates no humanos han sido bien documentados como reservorios altamente susceptibles a la infección por flavivirus, existiendo evidencia de la presencia de anticuerpos y material genético en muestras de varios tejidos de algunas especies, asimismo se han realizado estudios en otros grupos taxonómicos como aves, rumiantes, cánidos, équidos,

suidos, marsupiales, roedores, sorícidos, armadillos y perezosos. Se han realizado estudios en otros animales como: elefantes, caimanes, pecaríes, y algunas especies de hormigueros, con resultados negativos a DENV, aunque positivos a otros arbovirus (Gwee *et al.*, 2021).



**Figura 8.** Mapa de grupos taxonómicos en los cuales se ha detectado evidencia molecular y serológica de DENV

A continuación, se presenta una revisión sobre los hallazgos serológicos y moleculares de DENV realizados en animales:

#### Aves

Se han detectado anticuerpos contra los 4 serotipos de DENV en ejemplares de aves domésticas y silvestres en estudios realizados en Asia, Oceanía y África (Gwee *et al.*, 2021; Bonilla-Aldana *et al.*, 2024).

- **Australia, 1954:** se realizó el primer estudio de detección en aves y se lograron detectar anticuerpos neutralizantes contra DENV-1 en las especies:

*Leucopolius alexandrinus ruficapilus*, *Larus novaehollandiae*, *Callidris ruficollis minuta*, *Callidris acuminata* y *Heteroscelus brevipes* (Rowan *et al.*, 1957).

- **Australia, 1959:** se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes contra DENV-1 en la especie *Cacatua galerita* (Doherty *et al.*, 1963).
- **India, 1950, 1973 y 1981:** se han realizado 3 estudios con distintas especies de aves silvestres y domésticas (Gwee *et al.*, 2021; Bonilla-Aldana *et al.*, 2024). El primero de 1950 a 1962, en el cual se analizaron muestras de sueros de una gran variedad de aves. Las especies en las cuales se detectaron anticuerpos contra los 4 serotipos de DENV se enlistan a continuación: *Coracina novaehollandiae*, *Tephrodornis virgatus*, *Megalaima zaylanica*, *Chalcophaps indica*, *Treron phoenicoptera*, *Treron pompadoura*, *Centropus sinensis*, *Dicaeum agile*, *Lanius schach*, *Acrocephalus dumetorum*, *Copsychus saularis*, *Zoothera citrina*, *Pomathornitus schisticeps*, *Turdoides affinis*, *Turdus merula*, *Rhoppocichla atriceps*, *Nectarinia asiática*, *Gallus sonneratii*, *Galloperdix spadicea*, *Dryocopus javensis*, *Jynx torquilla*, *Lonchura striata*, *Pycnonotus jocosus*, *Pycnonotus cafer*, *Pycnonotus pirocephalus*, *Hypsipetes indicus*, *Gracula religiosa* (Ghosh *et al.*, 1975). El segundo trabajo fue realizado en 1973 en el cual se detectaron anticuerpos contra DENV-1 únicamente en dos especies: *Phalacrocorax niger* y *Bubulcus ibis* (Kaul *et al.*, 1976). Y por último el estudio de 1981, en el cual se obtuvieron resultados positivos a DENV-2 en gorriones, así como en anseriformes y galliformes domésticos (Loach *et al.*, 1983).
- **Uganda, 1970:** se llevó a cabo el análisis de sueros de diferentes especies de aves silvestres, en el cual se detectaron anticuerpos contra DENV en ejemplares de: *Inspidina picta*, *Merops superciliosus*, *Colius striatus*, *Pycnonotus tricolor*, *Dryscopus gambensis*, *Nectarinia kilimensis*, *Ploceus*

*velatus*, *Hyphanturgus nigricollis*, *Icteropsis pelzeni*, *Coliuspasser axillaris* (Okia *et al.*, 1970).

## Rumiantes

- **Australia, 1954, 1968 y 1974:** durante el periodo de 1954 a 1958 se realizó la detección de anticuerpos en ganado contra DENV-1 (Dohery *et al.*, 1963). A finales de la década de 1960, se realizó el monitoreo de sueros de bovinos y ovinos italianos, en el cual dos individuos fueron positivos a anticuerpos contra DENV-1 (Albanese *et al.*, 1971). Posteriormente en 1974 se realiza otro trabajo en Italia, en el cual fueron detectados anticuerpos contra DENV-1 en ovinos y bovinos (Castro *et al.*, 1976).
- **Pakistán, 1983:** se realizó la detección de anticuerpos contra DENV-1 en búfalos y ganado ovino (Darwish *et al.*, 1983).
- **India, 1995:** fueron detectados anticuerpos contra DENV-2 en búfalos y cabras (Mall *et al.*, 1995).
- **Guyana Francesa, 1994:** se detectaron anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 en venados del género *Mazama* (De Thoisy *et al.*, 2004).
- **República Democrática del Congo, 2013:** En la especie *Syncerus caffer nanus* se detectaron anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 (Kading *et al.*, 2013).

## Cánidos

En perros domésticos se han realizado estudios para la detección de anticuerpos y RNA viral en India y Tailandia, respectivamente (Gwee *et al.*, 2021).

- **India, 1995:** se publicaron los resultados de la detección de anticuerpos contra DENV-2 en India (Mall *et al.*, 1995).
- **Tailandia, 2008:** se analizaron muestras de perros en las cuales fue detectado mediante RT-PCR material genético de DENV-2 y 3, además de lograr el aislamiento de ambos serotipos (Thongyuan *et al.*, 2017).

## Equinos

Se han realizado estudios en Asia, Oceanía y América (Gwee *et al.*, 2021).

- **Australia, 1954:** fueron detectados anticuerpos en equinos contra DENV-1 y 2 durante 1954 a 1960 (Doherty *et al.*, 1964).
- **India, 1995:** se detectaron anticuerpos contra DENV-2 en caballos domésticos en 1995 (Mall *et al.*, 1995).
- **Brasil, 2009:** se detectaron anticuerpos contra DENV-1, 2 y 4 en equinos domésticos de Brasil (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2014).
- **Nueva Caledonia e Islas Marquesas, 2015:** fueron detectados anticuerpos contra DENV-1 en sueros de equinos (Beck *et al.*, 2019).

## Marsupiales

- **Guyana Francesa 1994 y 2001:** se detectó RNA viral de los 4 serotipos en las especies de marsupiales: *Caluromys philander*, *Micoureus demararae*, *Didelphis marsupialis*, *Marmosops parvidens*, *Marmosa murina*, *Philander*

*opossum* y anticuerpos contra DENV-2 en *Metachirus nudicaudatus* (De Thoisy *et al.*, 2004; De Thoisy *et al* 2009).

- **Australia, 1958:** se detectaron anticuerpos contra DENV-1 en las especies: *Macropus major*, *Macropus rufus*, *Wallabia elegans* y contra DENV-1 y 2 en *Wallabia rufogrisea* (Doherty *et al.*, 1964).

#### Cerdos

- **Malasia, 1962:** Se han detectado anticuerpos contra DENV-2 en cerdos en Malasia durante los periodos de 1962 a 1964 (Rudnick *et al.*, 1965).
- **India, 1978 y 1995:** Se detectaron anticuerpo contra DENV-2 (Kalimuddin *et al.*, 1982; Mall *et al.*, 1995).

#### Roedores

Se han realizado diferentes estudios en varias partes del mundo, en el que se ha llevado a cabo el monitoreo de especies del orden Rodentia en algunos de los cuales ha sido posible detectar anticuerpos y ARN de los cuatro serotipos de DENV (Gwee *et al.*, 2021; Bonilla-Aldana *et al.*, 2024), entre los cuales se encuentran:

- **Pakistan, 1983:** Se realizó el hallazgo de anticuerpos contra DENV-1 en *Tatera indica*, *Rattus rattus* y *Meriones hurriniae* (Darwish *et al.*, 1983).
- **Guyana Francesa, 1994:** Se detectaron anticuerpos contra DENV-2 en las especies *Dasyprocta leporina* y *Coendou spp* en un trabajo realizado entre 1994 y 1995 (De Thoisy *et al.*, 2004).
- **Guyana Francesa, 2001:** durante el periodo comprendido entre 2001 a 2007 se detectó RNA viral de los cuatro serotipos de DENV por medio de RT-PCR, en las especies: *Mesomys hispidus*, *Oecomys spp.*, *Oryzomys megacephalus*, *Zygodontomys brevicaudata*, *Proechimys cuvieri* (De Thoisy *et al.*, 2009).

- **México, 2011:** se detectaron anticuerpos contra DENV-2 en *Mus musculus* y *Rattus rattus* (Cigarroa-Toledo *et al.*, 2016).

Musarañas, armadillos y perezosos.

- **Malasia, 1962:** se detectaron anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 en la especie *Suncus murinus* (Rudnick *et al.*, 1965).
- **Guyana francesa, 2004:** a mediados de los años noventa se realizó la detección de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 en armadillos del género *Dasypus* (De Thoisy *et al.*, 2004).
- **Brasil, 2006:** se han encontrado anticuerpos contra los 4 serotipos de DENV en sueros de las especies de perezosos *Bradypus torquatus* y *Bradypus variegatus* en el periodo comprendido entre 2006 a 2014 (Catenacci *et al.*, 2018).

Primates no humanos

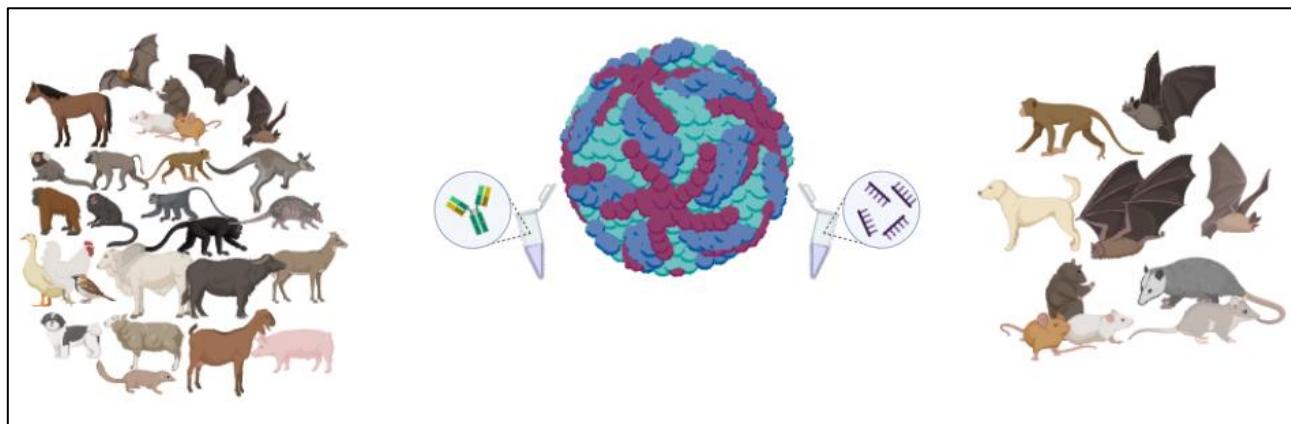
Desde la década de 1950, se han realizado diversos estudios enfocados en la detección de material genético y principalmente anticuerpos contra DENV, en primates no humanos, tales estudios se han llevado a cabo en varios países de Asia, África y América (Gwee *et al.*, 2021; Bonilla-Aldana *et al.*, 2024). Los estudios con resultados positivos a anticuerpos o RNA viral se describen a continuación:

- **Panamá, 1954:** en el cual se detectaron anticuerpos contra DENV-1 y 2 en ejemplares de la especie *Marikina* (*Saguinus*) *geoffroyi* (Kosen *et al.*, 1958).

- **Malasia, 1962:** se confirmó la presencia mediante serología, de anticuerpos contra el serotipo 2 de DENV en ejemplares de las especies *Macaca iris*, *Presbytis cristatus*, *Presbytis melalophos* y *Macaca nemestrina* (Rudnick *et al.*, 1965).
- **Nigeria, 1969:** se realizaron los análisis de muestras séricas de monos y gálagos en Nigeria obteniendo resultados positivos a anticuerpos contra DENV-2 (Fagbami *et al.*, 1977). En varios países asiáticos durante 1984, se detectaron anticuerpos neutralizantes contra los 4 serotipos de DENV en las especies *Macaca iris* y *M. fuscata* (Yuwono *et al.*, 1984).
- **Sri Lanka, 1986 y 1987:** se analizaron sueros de ejemplares de la especie *Macaca sínica*, realizando la detección de anticuerpos contra DENV-2 (de Silva *et al.*, 1999). Se detectaron anticuerpos neutralizante contra DENV-2 en sueros de ejemplares de la especie *Macaca sínica* (Peiris *et al.*, 1993).
- **Costa Rica 1993:** se analizaron sueros de diferentes especies, entre las cuales *Alouata palliata*, *Cebus imitator* y *Saimiri oerstedii* mostraron resultados positivos a anticuerpos contra los serotipos 2, 3 y 4 y a ARN de DENV-2 en *Alouatta palliata* y *Cebus imitator* (Dolz *et al.*, 2019).
- **Malasia, 1996:** la detección de anticuerpos contra DENV-2 en orangutanes silvestres y semicautivo (Wolfe *et al.*, 2001) y durante el mismo periodo, en el mismo país, se detectaron anticuerpos en orangutanes cautivos y silvestres de la especie *Pongo pygmaeus pygmaeus* (Killbourn *et al.*, 2003).
- **Gabón, 1998:** en ejemplares de *Mandrillus sphinx* fueron detectados anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 (Kading *et al.*, 2013).

- **Filipinas, 1999:** se realizó la detección de anticuerpos contra DENV en sueros de la especie *Macaca fascicularis* (Inoue *et al.*, 2003).
- **Senegal, 2003:** en el cual se confirmó la presencia de anticuerpos contra DENV-2 en *Chlorocebus sabaeus* (Diallo *et al.*, 2003).
- **Venezuela, 2006:** fue publicado un trabajo sobre monitoreo serológico en primates en cautiverio, de los cuales las especies *Alouatta seniculus* y *Pan troglodytes* arrojaron resultados positivos a anticuerpos contra DENV-2 (Zavala *et al.*, 2006).
- **Brasil, 2006, 2012 y 2015:** se han realizado 3 estudios con resultados positivos a la detección de anticuerpos contra DENV: de 2006 a 2014 se detectaron anticuerpos contra los 4 serotipos en las especies *Sapajus xanosthernos*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Bradypus torquatus* (Catenacci *et al.*, 2018); posteriormente de 2015-2016 las especies *Sapajus flavius* y *Sapajus lividinosus* mostraron resultados positivos contra los 4 serotipos (de Oliveira-Filho *et al.*, 2018); y finalmente durante el periodo de 2012 a 2017, se detectaron anticuerpos neutralizantes contra DENV-1 en la especie *Alouatta belzebul*, (Moreira-Soto *et al.*, 2018).
- **Tailandia, 2008:** se realizó el análisis serológico en *Macaca nemestrina* en el que se detectaron anticuerpos neutralizantes contra DENV (Nakgoi *et al.*, 2014).
- **Filipinas, 2010:** se detectaron anticuerpos neutralizantes y material genético de DENV en la especie *Macaca fascicularis* (Kato *et al.*, 2013).
- **Argentina, 2010:** se analizaron sueros de ejemplares de *Alouatta caraya*, mostrando anticuerpos contra DENV-1 y 3 (Morales *et al.*, 2017).

- **Puerto Rico, 2010:** se analizaron muestras de sangre de las especies *Erythrocebus patas* y *Macaca mulatta*, en las cuales se realizó el hallazgo de anticuerpos neutralizantes contra DENV-1, 3, y 4 (Hemme *et al.*, 2016).
- **Kenia, 2014:** se obtuvieron resultados positivos en la detección de anticuerpos contra los 4 serotipos en suero de las especies *Papio Anubis* y *Papio cynocephalus* (Eastwood *et al.*, 2017).



**Figura 9.** Esquema de algunos grupos taxonómicos en los cuales ha sido detectada evidencia serológica (izquierda) y molecular (derecha).

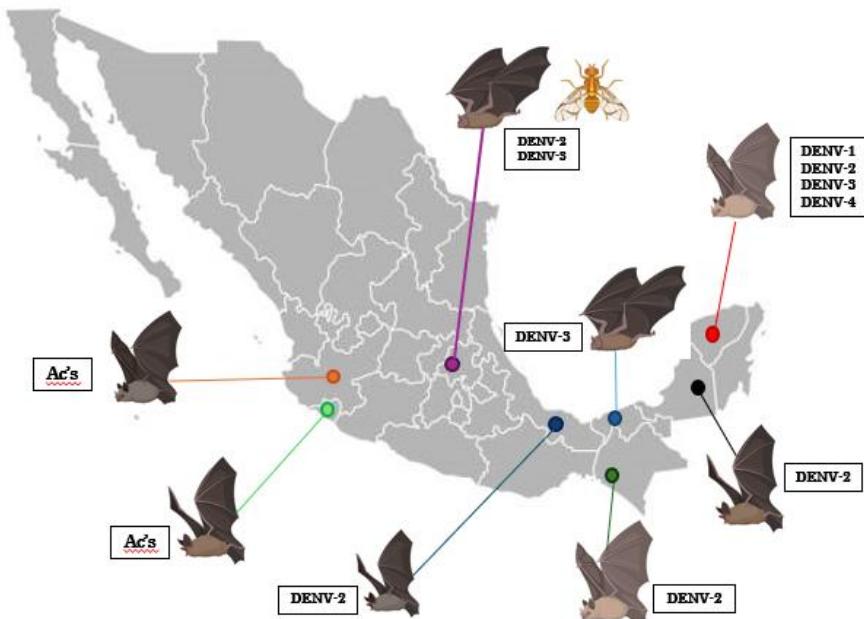
#### 2.8.10. DENV en quirópteros.

Diversos estudios han explorado la posible participación de los quirópteros en el ciclo ecológico de DENV, utilizando técnicas serológicas y moleculares para su detección entre las que destacan principalmente ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT), pruebas de ELISA y PCR en tiempo real. Estos enfoques han permitido identificar tanto evidencia serológica de exposición como presencia de ARN viral en diversos tejidos, aunque los resultados han sido controversiales y no concluyentes, lo que mantiene abierta la discusión sobre el papel real de los quirópteros en la dinámica ecológica del DENV. Los estudios realizados en los que se han detectado tanto anticuerpos como material genético se describen a continuación:

- **Australia, 1954 y 1956:** Los primeros trabajos sobre la detección de anticuerpos y material genético de flavivirus en murciélagos datan de mediados de la década de los años 50 en Queensland, donde tuvo lugar una epidemia de DENV durante 1953 a 1954. En dicho estudio se usaron muestras de cerebro, hígado y sangre de las especies *Pteropus scapulatus* y *P. goudi*. Se detectaron anticuerpos con alta relación serológica con DENV-1 y el virus de la encefalitis de Murray Valley (MVEV) (O'Connor *et al.*, 1955). Un par de años más tarde los autores trabajaron con muestras de aves migratorias y sueros de las especies *P. scapulatus* y *P. goudi*, detectando anticuerpos contra algunos *Orthoflavivirus*, entre ellos DENV-1 y DENV-2 (Rowan & Connor, 1957).
- **India, 1976:** se realizó un monitoreo de especies silvestres, aves y pequeños mamíferos, para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la encefalitis japonesa (JEV) en regiones afectadas en Bengala Occidental. En dicho estudio se detectaron anticuerpos mediante inhibición de la hemaglutinación contra DENV-3 en un espécimen de la especie *Cynopterus sphinx* (Kaul *et al.*, 1976).
- **Trinidad y Tobago, 1972:** se realizaron muestreos en los que fueron capturados varios ejemplares de diferentes especies para ser testeados contra varios arbovirus en el cual fue detectado DENV-2 mediante inhibición de la hemaglutinación. Los ejemplares que arrojaron resultados positivos son pertenecientes a las especies: *Anoura geoffroyi*, *Artibeus cinereus*, *Artibeus jamaisensis*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Molossus ater*, *Molossus molossus*, *Phyllostomus hastatus*, *Pteronotus davyi*, *Pteronotus parnelli*, y *Sturnira spp* (Price, 1978).
- **China, 1998:** en regiones en las que DENV es endémico en Hainan, se llevó a cabo la detección de dicho agente por RT-PCR a partir de muestras de

cerebro y suero de distintas especies de murciélagos, de los cuales varios ejemplares resultaron positivos a anticuerpos y a la detección de material genético de DENV-2 (Zhang *et al.*, 1998).

- **Ecuador y Costa Rica, 2000:** se realizó un dónde se muestraron murciélagos de los géneros *Artibeus*, *Uroderma* y *Molossus* en los que fueron detectados anticuerpos neutralizantes contra los serotipos 1,2, y 3 de DENV. Cabe señalar que se muestreó un único ejemplar de *D. rotundus* cuyos resultados fueron negativos (Platt *et al.*, 2000).
- **Guyana Francesa, 2001:** se publicó un trabajo sobre la detección de DENV en mamíferos de la selva del neotrópico en Guyana Francesa. Durante el periodo de 2001 a 2008 se realizaron capturas y muestreos de roedores, marsupiales y murciélagos. En estos últimos se encontraron resultados positivos a DENV-1, DENV-2 y DENV-3 mediante RT-PCR en muestras de hígado de especies de los quirópteros frugívoros e insectívoros: *Artibeus planirostris* y *Carollia perspicillata* (Thoisy *et al.* 2009).
- **México, 2005:** se realizó el primer estudio en México sobre la presencia de arbovirus en murciélagos en el que fueron capturados varios ejemplares en los estados de Colima, Jalisco y Veracruz. En los cuales fueron detectados anticuerpos contra DENV y contra NS1 en las especies *Myotis nigricans*, *Pteronotus parnellii* y *Natalus stramineus*; así como *Artibeus jamaicensis*. También fue detectado material genético de DENV-2 a partir de muestras de corazón, mediante RT-PCR en las especies *Myotis nigricans*, *Carollia brevicauda* y *Artibeus jamaicensis*, todos capturados en Veracruz durante la temporada de lluvias. Cabe destacar que los murciélagos positivos a DENV-2 fueron reportados como seronegativos (Aguilar-Setién *et al.*, 2008).



**Figura 10.** Serotipos de DENV detectados en quirópteros mexicanos mediante técnicas serológicas y moleculares.

- **México, 2010:** se realizó el trabajo de captura y detección de anticuerpos contra flavivirus (DENV, SLEV y WNV) en murciélagos del sureste de mexicano, en Yucatán; en el que fueron capturados 140 murciélagos pertenecientes a 7 especies distintas, de los cuales fue extraído suero para la realización del ensayo de neutralización por reducción de placa. 26 de los 140 sueros analizados pertenecientes a las especies *Artibeus jamaicensis*, *Artibeus lituratus* y *Glossophaga soricina* los cuales mostraron resultados positivos a los 3 flavivirus analizados y a los 4 serotipos de DENV (Machain-Williams *et al.*, 2013).
- **México, 2014:** se publicó otro trabajo en México, realizado en áreas no perturbadas en reservas de Campeche y Chiapas durante el periodo 2010-2011 en el que 146 muestras de bazos de murciélagos fueron analizadas mediante RT-PCR para la detección de los 4 serotipos de DENV, de los cuales 6 ejemplares de las especies *Artibeus Lituratus*, *Artibeus jamaicensis* y

*Glossophaga soricina* arrojaron resultados positivos para DENV-2 (Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2014).

- **México, 2016:** se publicó un trabajo sobre el estudio realizado durante 2011 y 2012 en temporada seca y de lluvias en 2 estados de México: Morelos (zona rural/ urbana) y Campeche (selva), donde fueron capturados 240 ejemplares de 18 especies, de los cuales se obtuvieron muestras de bazo e hígado que fueron analizadas mediante RT-PCR para DENV; así como suero para detección de anticuerpos neutralizantes. Todas las muestras analizadas mostraron resultados negativos, aun en especies que han resultado positivas a DENV en otros estudios pertenecientes a los géneros *Artibeus*, *Glossophaga* y *Carollia*. Dos ejemplares de *D. rotundus* también fueron incluidos en este estudio (Cabrera-Romo *et al.*, 2016).
- **Costa Rica, 2013:** fueron muestreados 318 murciélagos de diferentes especies, mismos que habitaban en cercanía con poblaciones humanas. Se realizó la histopatología de distintos órganos con la intención de detectar cambios patológicos asociados a la infección obteniendo resultados negativos en todos los casos. Se detectó una seroprevalencia de 21.2% con 51 sueros positivos a anticuerpos contra DENV y 28 muestras sanguíneas resultaron positivas a DENV, siendo detectados los 4 serotipos por medio de RT-qPCR. A 11 de estos animales positivos se les realizó RT-qPCR en intestino y se observaron resultados positivos en 2 ejemplares. Las especies en las que fue detectado RNA de DENV fueron *Eumops glaucinus*, *Rhogeessa bickhami*, *Glossophaga soricina*, *Molossus pretiosus*, *Molossus rufus* y *Molossus sinaloae*. No fue posible la realización de aislamiento viral de ninguna de las muestras de los ejemplares (Vicente-Santos *et al.*, 2017).
- **Uganda, 2009:** se realizó un trabajo en el que se muestrearon 626 murciélagos en Uganda, en el que se realizó la detección de anticuerpos neutralizantes por

medio de neutralización por reducción de placa, contra los arbovirus: RVFV, BBKV, DENV-2, ZIKV, YFV, WNV y otros *Orthoflavivirus* no determinados. Las especies de murciélagos que arrojaron resultados positivos a anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 son: *Chaerophon pumilus*, *Mops condylurus*, *Nycterus macrotis* y *Epomophorus labiatus* (Kading *et al.*, 2018).

- **México, 2014:** se llevó a cabo en la costa del Pacífico mexicano, en el estado de Jalisco, en un área no perturbada. En dicho estudio se capturaron y analizaron 1569 muestras de hígado y bazo de roedores y murciélagos, entre ellos ejemplares de especies previamente reportadas con resultados positivos y varios ejemplares de *D. rotundus*. Mediante PCR se realizó el análisis para la detección de material genético del género *Orthoflavivirus*, de las cuales, todas las muestras arrojaron resultado negativo, así como para la detección de anticuerpos en el suero de los roedores (Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2018).
- **México, 2014:** se llevó a cabo un estudio, que fue publicado finalmente en 2018, en el que se realizó la detección de DENV-2 en las moscas parasíticas *Strebla wiedemanni* y *Trichobius parasiticus*. Los ectoparásitos fueron extraídos de 160 ejemplares de *D. rotundus* presentes en un refugio en Progreso de Obregón, en el estado de Hidalgo, en una zona rural/urbana. Además, las muestras de hígado y bazo de 8 de estos 16 ejemplares también resultaron positivos a DENV-2 (Abundes-Gallego *et al.*, 2018).
- **Brasil, 2014:** se realizó un trabajo en el que se analizaron 103 muestras de suero, pulmones, hígado e intestino de murciélagos provenientes de áreas urbanas y periurbanas, en el cual por medio de PCR anidado e inhibición de la aglutinación se llevó a cabo la detección de material genético y anticuerpos contra arbovirus de los géneros *Orthoflavivirus* y *Alphavirus*, obteniendo resultados negativos de todas las muestras. Los murciélagos capturados eran

pertenecientes a 4 familias, y un ejemplar de *D. rotundus* fue analizado durante el estudio con resultados negativos (Bittar *et al.*, 2018).

- **Granada, 2015:** se realizó el análisis mediante neutralización por reducción de placa, de muestras de suero de las especies *Artibeus jamaisensis* y *Artibeus lituratus*, provenientes de zonas urbanas y rurales, para la detección de anticuerpos contra los arbovirus: CHIKV, WNV, SLEV, BSQV, RBV, VEEV, WEEV, EEV y los 4 serotipos de DENV. Los resultados positivos únicamente fueron arrojados para la detección de CHIKV, BSQV y VEEV (Stone *et al.*, 2018).
- **Brasil, 2015:** se analizaron muestras de varios órganos de murciélagos capturados en Brasil. Una única muestra de cerebro de un ejemplar de la especie *Platyrrhinus helleri* arrojó resultados positivos por medio de RT-qPCR para el serotipo DENV-4 (Franco-Filho *et al.*, 2023).
- **México, 2016:** fue realizado un estudio centrado en *D. rotundus*, en el cual 45 ejemplares fueron capturados en los estados de Puebla, Guanajuato y Yucatán durante la temporada de lluvias. Sus muestras fueron procesadas para la detección del virus rábico (RABV) y los arbovirus CHIKV, DENV y ZIKV. Se obtuvieron resultados positivos únicamente para RABV y ZIKV (Espinoza-Gómez *et al.*, 2022).
- **Costa Rica, 2017:** Se capturaron 144 ejemplares de 26 especies, encontrando anticuerpos contra los 4 serotipos de DENV, de los cuales se detectaron por medio de PRNT anticuerpos contra DENV-1 y DENV-4 en dos ejemplares hembras de *D. rotundus* (Barrantes-Murillo *et al.*, 2022).

- **Singapur, 2019:** Se publicó un trabajo en Singapur, en el que se realizaron infecciones experimentales en líneas celulares de murciélagos. Así mismo se realizó la detección de anticuerpos contra ZIKV y DENV-2 en las especies de los pteropódidos *Eonycteris spelaea* y *Cynopterus brachyotis* (Irving *et al.*, 2019).
- **Colombia, 2019:** se analizaron 286 muestras de hígado, cerebro, pulmones, corazón, riñón y bazo de murciélagos provenientes de áreas urbanas y rurales. Se realizó la detección de DENV mediante RT-PCR anidada para el cual dos ejemplares de las especies *Carollia perspicillata* y *Phyllostomus discolor* mostraron resultados positivos altamente relacionados con DENV-2 (Calderón *et al.*, 2019).

### III. Justificación

Los murciélagos, constituyen un reservorio importante para una amplia gama de patógenos zoonóticos. El proceso de antropización y el cambio de uso de suelo han propiciado un contacto cada vez más estrecho entre sus poblaciones, el ganado y los seres humanos, incrementando significativamente el riesgo de emergencia y transmisión de enfermedades.

*Desmodus rotundus*, es una de las 3 especies de quirópteros hematófagos, y la especie con mayor distribución y abundancia en el continente americano, incluido México. Esta especie posee una relevancia singular en salud pública y veterinaria, no solo por su condición de vector mecánico de patógenos a través de la mordedura, sino también por su papel potencial como reservorio de diversos agentes etiológicos, incluyendo virus, bacterias y parásitos de impacto zoonótico.

Sus hábitos alimenticios de hematófagos le proveen de un contacto muy estrecho tanto con fauna silvestre, ganado actuando como un puente epidemiológico entre los ciclos silvestres y los sistemas de producción animal. Este contacto, sumado a la interacción con ectoparásitos hematófagos (como garrapatas y moscas) que infestan tanto al vampiro como a sus hospedadores, posiciona a *D. rotundus* como un modelo clave y un punto de convergencia crítico para el estudio de la ecología y dinámica de transmisión de enfermedades vectoriales en la interfaz humano-animal-ambiente. Por lo tanto, investigar los patógenos que alberga esta especie es un paso fundamental para la implementación de estrategias de vigilancia epidemiológica proactiva y la prevención de futuros eventos de *spillover*.

#### IV. Hipótesis

Los tejidos del murciélagos hematófago *Desmodus rotundus* contienen material genético de agentes zoonóticos transmitidos por artrópodos.

#### V. Objetivos

##### 5.1. Objetivo General

Detectar mediante técnicas moleculares material genético de organismos del orden Piroplasmida, el género *Rickettsia* y los 4 serotipos de DENV en tejidos de *Desmodus rotundus* de México.

##### 5.2 Objetivos Específicos

1. Colectar y extraer muestras de sangre y órganos de ejemplares de *D. rotundus* en distintas locaciones de México.
2. Detectar material genético de agentes pertenecientes al género *Rickettsia*, al orden Piroplasmida, y los 4 serotipos de DENV.

## VI. Materiales y métodos

El presente trabajo fue realizado bajo la autorización y siguiendo las recomendaciones y lineamientos del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) oficio **121FCN2023**, la Secretaría de Medio Ambiente oficio y Recursos Naturales (SEMARNAT) oficio SPARN/DGVS/01623/24 y el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).

### 6.1 Captura de especímenes

La captura de los ejemplares de *D. rotundus* se realizó durante la temporada seca, entre febrero y junio de 2024, periodo que coincidió con una epidemia de dengue en México. El muestreo se realizó en 3 localidades de la República Mexicana: Valle Verde, en el municipio de Jalpan de Serra, Querétaro ( $21^{\circ}30'26.1''N$   $99^{\circ}10'15.3''W$ ); Progreso de Obregón en Hidalgo ( $20^{\circ}15'48''N$ ;  $99^{\circ}11'28''W$ ); y Poaná, en el municipio de Tacotalpa, Tabasco ( $17^{\circ}32'45.2''N$   $92^{\circ}45'09.5''W$ ).

#### Descripción de los sitios de estudio:

- **Hidalgo:** Refugio cercano a zonas rurales, ubicado en un área con actividades ecoturísticas.
- **Tabasco:** Refugios naturales en una zona boscosa, adyacente a comunidades rurales.
- **Querétaro:** Potrero ubicado en una zona boscosa, alejada de asentamientos humanos.

La captura de los ejemplares fue realizada por medio de redes de niebla de 3 a 12 metros de largo, con apertura de malla de entre 30-36 mm, colocadas en potreros y en la entrada/ salida de refugios, mismas que fueron revisadas para corroborar la captura de los ejemplares con intervalos de 5 a 10 minutos (Kunz & Kurta, 1988; Bracamonte, 2018; Darras

*et al.*, 2021) durante un total de 7 horas (7 pm-2 am) aproximadamente (Romero-Barrera *et al.*, 2021). Se llevó a cabo la identificación taxonómica de los individuos capturados por medio de la guía de Identificación de los murciélagos de México (Medellín, 1997) y la subsecuente liberación inmediata y cuidadosa de ejemplares juveniles (los cuales se clasificaron como tal, si no presentaban los testículos descendidos y las epífisis de los huesos de las alas no osificados), hembras gestantes y lactantes; así como de ejemplares de cualquier especie distinta a *D. rotundus*.

Cada ejemplar de *D. rotundus* capturado, fue retirado de las redes, inspeccionado para la detección de la presencia de garrapatas y posteriormente resguardado en sacos de tela, dispuestos en lugares oscuros y con los menores disturbios auditivos y vibratorios posibles evitando al máximo la generación de estrés en los ejemplares; hasta la toma de muestra, asignando un código de identificación único por individuo (Kunz & Kurta, 1988).

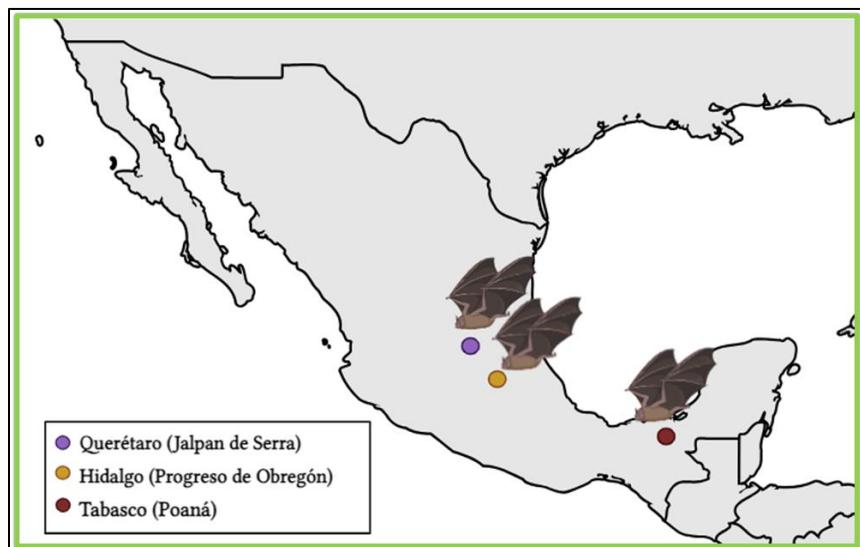


Figura 11. Mapa de los sitios de captura y muestreo de los ejemplares de *D. rotundus*.

## 6.2 Toma de muestras

### 6.2.1 Obtención de muestras sanguíneas

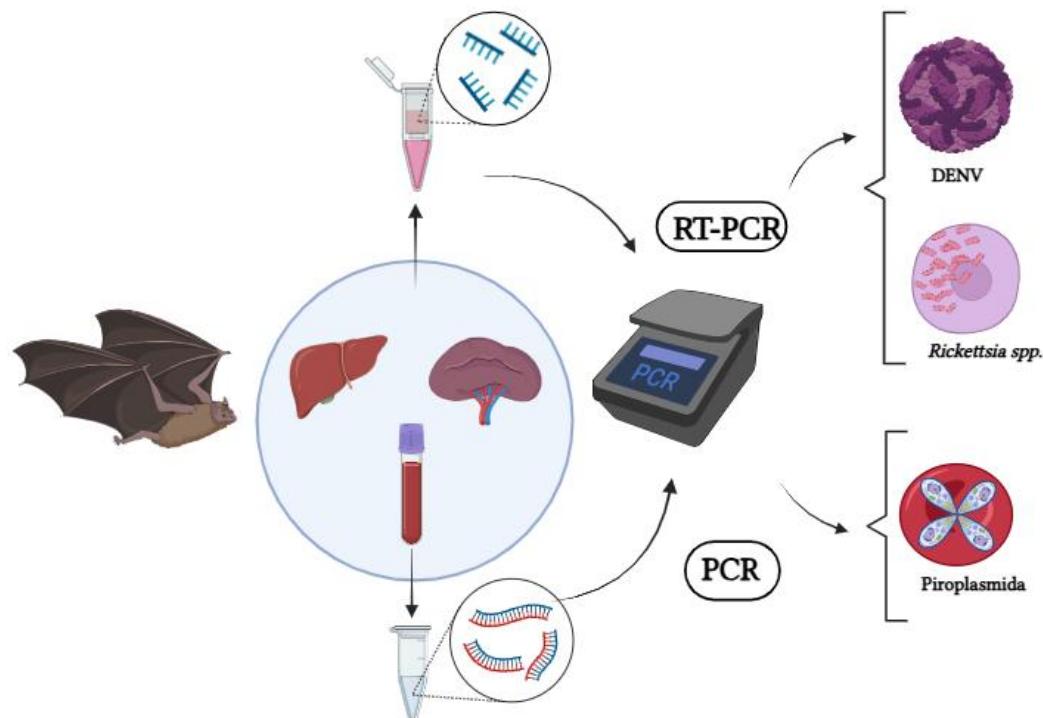
La toma de muestras sanguíneas se realizó mediante venopunción de la vena braquial. Previa contención manual de los ejemplares y antisepsia de la zona con etanol al 70%, se efectuó la punción utilizando agujas calibre 21G x 32mm. El volumen de sangre extraído fue inferior al 1% del peso corporal del individuo, utilizando para ello tubos capilares. Finalizado el procedimiento, se aplicó presión local para garantizar la hemostasia mecánica y minimizar la formación de hematomas. En el caso de los ejemplares destinados para eutanasia, se obtuvieron las muestras sanguíneas mediante punción cardiaca directa con jeringas de 3 mL con agujas de 21G x 32mm, posterior a la insensibilización de cada ejemplar. Se realizaron de 2 a 3 frotis sanguíneos *in situ* de cada uno de los ejemplares, los cuales fueron inmediatamente fijados por medio de inmersión en metanol. El resto de la muestra se almacenó en tubos con EDTA como anticoagulante y mantenida temporalmente a -4°C hasta su arribo al laboratorio donde fueron almacenadas a -20°C para la extracción de ADN (Eshar & Weinberg, 2010; Racey, 2011; Ellison *et al.*, 2013; Biodiversity Research Institute, 2022).

### 6.2.2 Toma de muestras de tejidos

Las eutanasias se llevaron a cabo conforme a los protocolos establecidos en las directrices de la American Veterinary Medical Association (AVMA), *Guidelines for the euthanasia of animals* (2020) y de la Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), *Standard Operating Procedure for the Study of Bats in the Field* (Ellison, 2023). Este método consistió en una insensibilización química seguida de una sobredosis de anestesia, atendiendo las recomendaciones de la NOM-033-SAG/ZOO -2014 sobre los métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres, (apartado 7.5.4.). El manejo de los cadáveres y tejidos se realizó conforme a los lineamientos de los siguientes documentos: *Wild bat & rodent capture, handling and fieldwork* (UASLP, 2017a), *Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing* (Mills *et al.*, 1995) publicado por el CDC y el ya citado

*Standard Operating Procedure for the Study of Bats in the Field* (Ellison, 2023). Estos fueron usados posteriormente con fines de investigación y docencia para realizar el máximo aprovechamiento de los ejemplares.

Posterior a la eutanasia, se procedió a la necropsia de los ejemplares bajo el protocolo propuesto en el documento titulado *Wild bat & rodent necropsy and sample collection* (UASLP, 2017b), la cual se realizó con estrictas técnicas de asepsia, incidiendo la piel de la región suprapública, posteriormente se continuó la incisión en dirección caudo-craneal, paralelo al plano sagital hasta alcanzar el xifoides, para posteriormente cortar las costillas accediendo a la caja torácica para obtener los pulmones y para realizar la punción intracardiaca. Después, se realizó la colecta de bazos, pulmones, hígados e intestinos, mismos que fueron almacenados en solución inhibidora de nucleasas (RNAlater Invitrogen™ AM7024) para mantener la integridad de los ácidos nucleicos. Las muestras se mantuvieron provisionalmente a -4°C hasta su arribo al laboratorio donde permanecieron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento (UASLP, 2017b).



**Figura 12.** Esquema de las técnicas empleadas para la detección de los agentes evaluados.

## 6.3. Extracción de ADN y ARN de muestras de sangre y órganos

### 6.3.1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre.

La extracción de ADN a partir de las muestras de sangre se realizó mediante el kit comercial DNeasy Blood & Tissue, QIAGEN® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 100  $\mu$ L de muestra sanguínea con anticoagulante, a la cual se le añadieron 20  $\mu$ L de proteinasa K y 100  $\mu$ L de buffer fosfato salino (PBS), posteriormente se añadieron 200  $\mu$ L de buffer para lisis (AL Buffer, QIAGEN®) se homogenizó durante 30 segundos mediante el uso de *vortex* y se llevó a incubación de 56°C durante 10 minutos. Después se añadieron 200  $\mu$ L de etanol al 100% y se mezcló el contenido durante 30 segundos para ser transferido a tubos con columnas para la separación por afinidad del ADN, y fue centrifugado a 8000 rpm durante 1 minuto y fue descartado el sobrenadante.

Posteriormente fueron añadidos 500  $\mu$ L del buffer de lavado (AW1 Buffer, Quiagen®) y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, y se descartó el sobrenadante. Después se añadieron 500  $\mu$ L del segundo buffer de lavado (AW2 Buffer, Quiagen®), se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos descartando el sobrenadante. Finalmente se realizó la elución en agua libre de nucleasas (AE Buffer, QIAGEN®), obteniendo 200  $\mu$ L de ADN total.

La concentración y pureza del ADN total obtenido se cuantificaron mediante espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Scientific®). Para verificar la integridad del ADN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 50 V durante 50 minutos. Usando 1  $\mu$ L de buffer de carga (6x) con GelRed (Biotium®) como agente intercalante y 5  $\mu$ L de ADN.

### 6.3.2. Extracción de ADN a partir de muestras de Bazo.

La extracción de ADN de las muestras de bazo se realizó por medio del kit comercial (Quick-DNA™ Miniprep Kit) Inicialmente se siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inicialmente se realizó la inmersión del tejido (5 mg) en 200  $\mu$ L buffer de lisis y posteriormente en nitrógeno líquido, inmediatamente maceró en mortero, se homogenizó mediante vortex y se realizó una incubación de 56°C por una hora. Posteriormente centrifugó el tejido lisado a 10,000 x g durante 5 minutos. Una vez que se obtuvo la fracción líquida, se transfirió el sobrenadante a una columna dentro de un tubo colector, para ser centrifugada nuevamente a 10,000 x g durante un minuto, para posteriormente desechar el tubo colector.

Posteriormente se transfirió la columna de un nuevo tubo colector y se añadieron 200  $\mu$ l de buffer de prelavado de ADN e inmediatamente se realizó otra centrifugación de 10,000 x g por un minuto. Despues se añadieron 500  $\mu$ l de buffer de lavado de ADN a la columna y se centrifugó a 10,000 x g por un minuto.

Finalmente, la columna fue transferida a un tubo cónico de 1.5 mL, en la cual se añadieron 50  $\mu$ l de buffer de elución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos para eluir el ADN.

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría mediante el equipo NanoPhotometer® NP80, utilizando 1  $\mu$ L del ADN. Para verificar la integridad del ADN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando Diamond™ Nucleic Acid Dye como agente intercalante y 5  $\mu$ L de ADN.

### 6.3.3. Extracción de ARN a partir de muestras de Hígado.

La extracción de ARN de las muestras de hígado se realizó por medio del kit comercial (*Quick-RNA™ Viral Kit*, Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Inicialmente el tejido hepático (5 mg) fue embebido en 600  $\mu$ L de buffer para lisis celular, después fue disgregado con ayuda de una hoja de bisturí hasta tener pequeñas partículas. El material obtenido fue llevado a un tubo de 1.5 mL y centrifugado a 12 000 rpm por 3 minutos.

Una vez que se obtuvo la fracción líquida, se volvió a centrifugar durante 1 minuto a 12,000 rpm descartando los restos tisulares y recuperando únicamente el sobrenadante en

un tubo nuevo de 1.5 mL. Después se añadieron 400 $\mu$ L de solución estabilizadora para ácidos nucleicos (DNA/RNA Shield<sup>TM</sup>, Zymo Research), se homogenizó la mezcla por medio de *vortex* durante 30 segundos y se continuó con el proceso de purificación. Se añadió buffer para la lisis de los viriones y la liberación de ARN (Viral RNA Buffer<sup>TM</sup>, Zymo Research) con una relación 2:1 y se homogenizó mediante *vortex* durante 30 segundos para ser transferido a tubos con columnas afines a las cargas negativas del ARN y posteriormente ser centrifugado durante 2 minutos a 12,000 rpm, transfiriendo la columna a un nuevo tubo colector.

Se realizaron dos lavados consecutivos con 500 $\mu$ L de buffer de lavado para ácidos nucleicos (Viral Wash Buffer<sup>TM</sup>, Zymo Research) centrifugando durante 30 segundos cada uno y descartando la fracción líquida. Posteriormente se añadieron 500  $\mu$ L de etanol (100%) y se centrifugó por un minuto descartando la fracción líquida. Finalmente se realizó la elución del ARN en agua libre de nucleasas, durante 30 segundos a 12,000 rpm, obteniendo 35  $\mu$ L de ARN total.

El ARN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría mediante el equipo NanoPhotometer<sup>®</sup> NP80, utilizando 1  $\mu$ L de ARN.

#### 6.4. Retrotranscripción

Se realizó el proceso de retrotranscripción por medio del kit comercial de ProtoScript<sup>®</sup> II First Strand cDNA Synthesis Kit, New England Biolabs<sup>®</sup> siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usaron 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción ProtoScript II (2x), 1  $\mu$ L de la enzima retrotranscriptasa (10x), 1  $\mu$ L de mezcla de iniciadores aleatorios (60 $\mu$ M), 11  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, y 2  $\mu$ L de ARN previamente extraído, para obtener un total de 20  $\mu$ L finales de cDNA por cada muestra.

## 6.5. Detección de material genético

### 6.5.1. RT-PCR para la amplificación de *gapdh*

Como control para asegurar la correcta extracción de ARN y ADN se realizó la técnica de RT-PCR para la amplificación de una región del gen endógeno de mamíferos codificante para un fragmento de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), utilizando el protocolo propuesto por Meshram *et al.*, 2024.

Para las reacciones se utilizaron los iniciadores GAPDH(F) (5'-CACTAGGCGCTCACTGTTCTC -3') y GAPDH(R) (5'- GACTCCACGACGTACTCAGC -3') usando 1  $\mu$ L de cada uno, 5  $\mu$ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher <sup>TM</sup>) (2x), 2  $\mu$ L agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ L de cDNA, para la obtención final de 10  $\mu$ L por reacción. Como control positivo se usó cDNA de hígado murino y agua libre de nucleasas como control negativo. El protocolo de termociclado se muestra en el cuadro 7.

**Cuadro 6.** Iniciadores usados para la detección del gen endógeno *gapdh* en muestras de bazo e hígado.

Nombre	Secuencia	Gen blanco	Referencia
<b>GAPDH (F)</b>	5'- CACTAGGCGCTCACTGTTCTC -3'	<i>gapdh</i>	Meshram <i>et al.</i> , 2024
<b>GAPDH (R)</b>	5'- GACTCCACGACGTACTCAGC -3'		

**Cuadro 7.** Condiciones de termociclado para la RT-PCR para la detección del gen *gapdh* (Meshram *et al.*, 2024).

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Incubación</b>	50°C	2 minutos	
<b>Desnaturalización Inicial</b>	95°C	10 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	95°C	15 segundos	
<b>Alineamiento</b>	60°C	30 segundos	<b>40 ciclos</b>
<b>Extensión</b>	72°C	30 segundos	
<b>Extensión final</b>	72°C		

#### 6.5.2. PCR punto final, semianidado y anidado para la detección de Piroplásmidos.

Se utilizaron 3 protocolos de PCR independientes para la identificación de piroplásmidos, los cuales amplifican fragmentos de diferentes tamaños del gen *18S rRNA* del orden Piroplasmida. Se usaron iniciadores que amplifican para fragmentos de diferente tamaño del gen *18S rRNA* utilizados por Casati *et al.*, 2006.

**Cuadro 8.** Iniciadores usados para la detección de piroplásmidos.

Nombre	Secuencia	Gen blanco	Referencia
<b>BJ1</b> <b>BN2</b>	5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGATGG-3' 5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3'	<i>18S rRNA</i> (425 pb)	Casati <i>et al.</i> , 2006
<b>RLB F</b> <b>RLB R</b>	5'-GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT A-3' 5'-TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC-3'		
<b>RLB FINT</b> <b>RLB R</b>	5'-GAC AAG AAA TAA CAA TAC RGG GC-3' 5'-TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC-3'	<i>18S rRNA</i> (460-520 pb)	Gubbels <i>et al.</i> , 1999
<b>BTF1</b> <b>BTR1</b>	5'-GGC TCA TTA CAA CAG TTA TAG-3' 5'-CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCT C-3'	<i>18S rRNA</i> (~800 pb)	Mongruel <i>et al.</i> , 2022,
<b>BTF2</b> <b>BTR2</b>	5'-CCG TGC TAA TTG TAG GGC TAA TAC-3' 5'-GGA CTA CGA CGG TAT CTG ATC G-3'		

**Protocolo 1:** PCR punto final (Casati *et al.*, 2006). Se utilizaron los iniciadores BJ1 (5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGATGG-3') y BN2 (5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3') que amplifican un fragmento de 425 pb del gen *18S rRNA*. Se llevaron a cabo reacciones de 25 µL, las cuales se realizaron usando 12.5 µL MyTaq™ DNA Polymerase (Meridian BIOSCIENCE) (2x), 1 µL de iniciadores (10 µM), 8.5 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADN extraído de sangre como templado. Como control positivo se usó ADN purificado de *B. vogeli* y agua libre de nucleasas como control negativo. Las condiciones de termociclado se detallan en el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Condiciones de termociclado para el PCR punto final (Casati *et al.*, 2006).

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	94°C	10 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	94°C	1 minuto	
<b>Alineamiento</b>	56.7°C	1 minuto	35 ciclos
<b>Extensión final</b>	72°C	2 minutos	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos	

**Protocolo 2:** PCR semianidado (Gubbels *et al.*, 1999). Se usaron los iniciadores externos RLB F (5'-GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT A-3') y RLB R (5'-TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC-3'); así como los iniciadores internos RLB FINT (5'-GAC AAG AAA TAA CAA TAC RGG GC-3') y RLB R (5'-TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC-3'). Mismos que detectan un fragmento 460-520 pb del gen *18S rRNA* del orden Piroplasmida. La primera ronda de PCR se realizó usando: 6.5 μL de MyTaq™ DNA Polymerase (Meridian BIOSCIENCE) (2x), 0.5 μL de iniciadores (10 μM), 3.25 μL de agua libre de nucleasas y 2 μL de ADN extraído de sangre completa como templado. Y en la segunda ronda se usaron: 6.5 μL de MyTaq™ DNA Polymerase (Meridian BIOSCIENCE) (2x), 0.5 μL de iniciadores (10 μM), 4.25 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de ADN. Como control positivo se usó ADN de *B. vogeli* y agua libre de nucleasas como control negativo. Las condiciones de termociclado se detallan en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Condiciones de termociclado para el PCR semianidado (Gubbels *et al.*, 1999).

Primera reacción				Segunda reacción			
Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	94°C	3 minutos		<b>Desnaturalización Inicial</b>	94°C	3 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 segundos		<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 minuto	
<b>Alineamiento</b>	50°C	45 segundos	35 ciclos	<b>Alineamiento</b>	55°C	45 segundos	35 ciclos
<b>Extensión</b>	72°C	1 minuto		<b>Extensión</b>	72°C	1 minuto	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos		<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos	

**Protocolo 3:** PCR anidada (Mongruel *et al.*, 2022). Se usaron los iniciadores externos BTF1 (5'-GGC TCA TTA CAA CAG TTA TAG-3') y BTR1 (5'-CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCT C-3'); así como los iniciadores internos BTF2 (5'-CCG TGC TAA TTG TAG GGC TAA TAC-3') y BTR2 (5'-GGA CTA CGA CGG TAT CTG ATC G-3') que amplifican un fragmento de 800 pb del gen *18S rRNA* del orden Piroplasmida. La primera reacción se llevó a cabo usando: 6.25 µL de MyTaq™ DNA Polymerase (Meridian BIOSCIENCE) (2x), 0.5 µL de iniciadores (10 µM), 3.25 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADN extraído de sangre completa como templado. En la segunda reacción se usaron: 6.25 µL de MyTaq™ DNA Polymerase (Meridian BIOSCIENCE) (2x), 0.5 µL de iniciadores (10 µM), 4.25 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN. Como control positivo se usó ADN de *B. vogeli* y agua libre de nucleasas como control negativo. Las condiciones de termociclado se detallan en el cuadro 11.

**Cuadro 11.** Condiciones de termociclado para el PCR anidada (Mongruel *et al.*, 2022).

Primera reacción				Segunda reacción			
Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	93°C	3 minutos		<b>Desnaturalización Inicial</b>	93°C	3 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 segundos		<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 segundos	
<b>Alineamiento</b>	62°C	20 segundos		<b>Alineamiento</b>	58°C	20 segundos	
<b>Extensión</b>	72°C	30 segundos		<b>Extensión</b>	72°C	30 segundos	
<b>Extensión final</b>	72°C	7 minutos		<b>Extensión final</b>	72°C	7 minutos	

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotium. A 100V durante 35 minutos usando un volumen de 5µL por producto amplificado.

#### 6.5.3. RT-PCR para la detección de *Rickettsia* spp.

La detección de ADN del género *Rickettsia* se realizó mediante qPCR usando los iniciadores descritos por Blanda *et al.*, (2020): qOmpBFw (5'-CAGCCTGACAGAACCGCTAAA-3') y qOmpBRev (5'CGATTCCGTACTCCAATCTTAGCA-3').

**Cuadro 12.** Iniciadores utilizados para la detección de *Rickettsia* spp. mediante RT-PCR SYBR Green (Blanda *et al.*, 2020).

Nombre	Secuencia	Gen blanco	Referencia
qOmpBFw	5'-CAGCCTGACAGAACCGCTAAA-3'	<i>ompB</i> (84 pb)	Blanda <i>et al.</i> , 2020
qOmpBRev	5'-CGATTCCGTACTCCAATCTTAGCA-3'		

Este par de iniciadores amplifica un fragmento de 87 pares de bases (pb) del gen que codifica para la proteína de membrana externa B (OmpB). Se realizaron reacciones de 10 µL usando 5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher™) (2x), 0.5 µL de cada iniciador (10 µM), 2 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADN extraído de bazos como templado. Las condiciones de termociclado se detallan en el cuadro 13. Las reacciones incluyeron una curva estándar elaborada a partir de ADN control positivo diluido en serie desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^7$ .

**Cuadro 13.** Condiciones de termociclado para la RT-PCR (Blanda *et al.*, 2020).

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	94°C	10 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	94°C	1 minuto	
<b>Alineamiento</b>	60°C	1 minuto	39 ciclos
<b>Extensión final</b>	72°C	2 minutos	
<b>Extensión final</b>	72°C		

#### 6.5.4. RT-PCR para la detección de DENV

Se realizó un tamizado general con una reacción con iniciadores para la detección de los 4 serotipos de DENV (1, 2, 3 y 4) (Cuadro 14). Posteriormente se realizaron reacciones específicas para cada serotipo con las muestras positivas al tamizaje, los detalles de termociclado se detallan en el cuadro 15. Cada iniciador, tiene como blanco la detección de regiones de las proteínas NS5 para DENV-1, DENV-1-FW (5'-CAAAAGGAAGTCGYGCAATA-3') y DENV-1-RV (5'-CTGAGTGAATTCTCTGCTGCTRAAC-3'); E para DENV-2, DENV-2-Fw (5'-CAGGCTATGGCACYGTCACGAT-3') y DENV-2-RV (5'-CCATYTGCAGCARMACCACATCTC-3'); y prM para DENV-3, DENV-3-FW (5'-GGACTRGACACACGCACCCA-3') y DENV-3-RV (5'-CATGTCTTACCTTCTGACTTGYCT-3'); y DENV-4, DENV-4-Fw (5'-TTGTCTTACCTTCTGACTTGYCT-3') y DENV-4-RV (5'-TCCACCCYGAGACTCCTTCCA-3') cuyas características se detallan en el cuadro 14. Los iniciadores empleados para la detección de los 4 serotipos son usados para la detección de DENV por organismos de referencia como el INDRE en México y el CDC en Estados Unidos.

**Cuadro 14.** Iniciadores para la detección de las regiones codificantes de las proteínas NS5, E y prM presentes en DENV.

Nombre	Secuencia	Región amplificada	Referencia
DENV-1 FW DENV-1 RV	5'-CAAAAGGAAGTCGYGCAATA -3' 5'- CTGAGTGAATTCTCTGCTGCTRAAC-3'	NS5 (112 pb)	Santiago <i>et al.</i> , 2013
DENV-2 FW DENV-2 RV	5'- CAGGCTATGGCACYGTCACGAT-3' 5'- CCATYTGCAGCARMACCACATCTC-3'	E (78 pb)	Santiago <i>et al.</i> , 2013
DENV-3 FW DENV-3 RV	5'-GGACTRGACACACGCACCCA -3' 5'-CATGTCTTACCTTCTGACTTGYCT-3'	prM (74 pb)	Santiago <i>et al.</i> , 2013
DENV-4 FW DENV-4 RV	5'-TTGTCTTACCTTCTGACTTGYCT-3' 5'-TCCACCCYGAGACTCCTTCCA - 3'	prM (89 pb)	Santiago <i>et al.</i> , 2013

Se realizaron reacciones 10  $\mu\text{L}$  las cuales se realizaron usando 5  $\mu\text{L}$  de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher <sup>TM</sup>) (2x), 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 3  $\mu\text{L}$  de cDNA sintetizado a partir de ARN extraído de muestras de hígado. Las condiciones de termociclado se detallan en el cuadro 15.

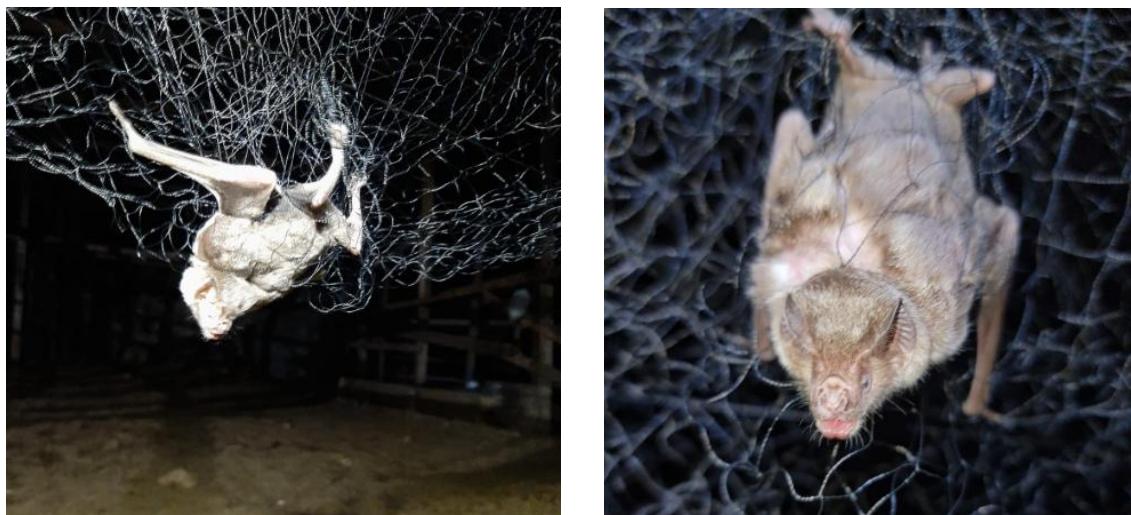
**Cuadro 15 14.** Condiciones de termociclado para el RT-PCR para la detección de DENV-1, DENV.2 DENV.2 y DENV-4 con el protocolo propuesto por Santiago *et al.*, 2013, que amplifica un fragmento de los genes codificantes para las proteínas NS5, E y prM de DENV.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	95°C	10 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	95°C	15 segundos	
<b>Alineamiento</b>	60°C	30 segundos	
<b>Extensión</b>	72°C	30 segundos	<b>45 ciclos</b>

## VII. Resultados

### 7.1. Captura de especímenes

Se capturó un total de 32 ejemplares de *Desmodus rotundus*, 20 de ellos provenientes de Progreso de Obregón, Hidalgo; 2 de Jalpan de Serra, Querétaro; y 10 ejemplares de Poaná, Tabasco.



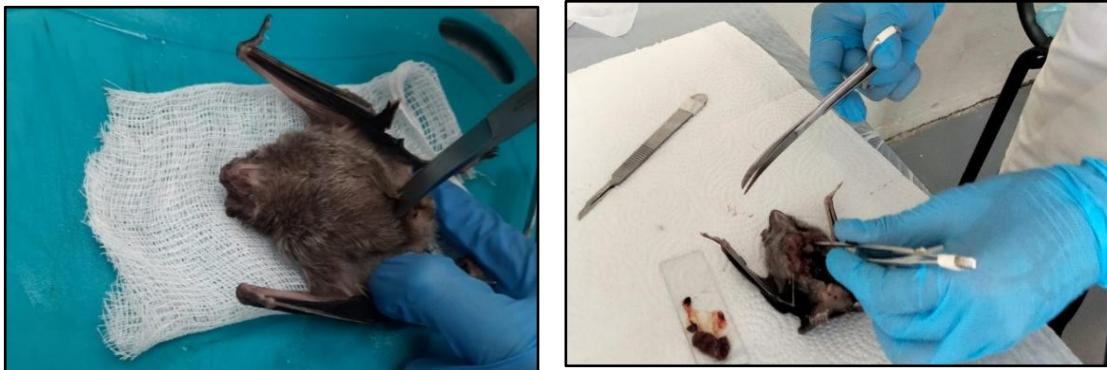
**Figura 13.** Ejemplares de *D. rotundus* capturados mediante redes de niebla en Jalpan de Serra.

Se obtuvieron 29 muestras de sangre con volúmenes entre 150 a 2000  $\mu\text{L}$ ; 32 muestras de hígado, 32 muestras de bazo, 32 muestra de pulmón y 32 muestras de intestino. Se obtuvieron 3 muestras de corazón de 3 ejemplares de los cuales fue imposible la obtención de muestras sanguíneas. Se realizaron hallazgos de alteraciones en algunos ejemplares tales como ictericia, hepatomegalia y linfadenomegalia.



**Figura 14.** Punción de la vena braquial para la obtención de sangre mediante tubos capilares para la realización de frotis.

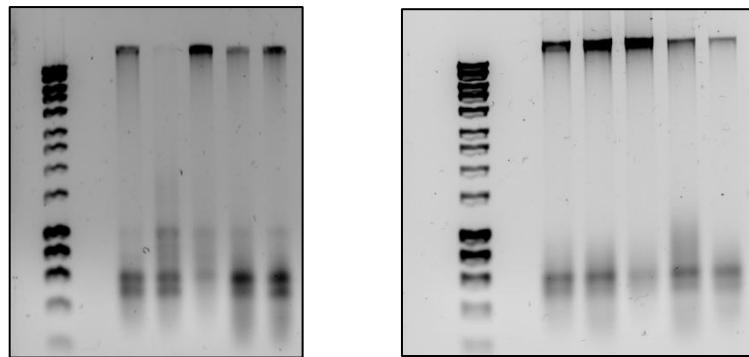
No se realizó el hallazgo de ningún ixódido o argásido en ninguno de los ejemplares de *D. rotundus* capturados. Los únicos ectoparásitos detectados durante la inspección fueron ejemplares de *S. wiedemanni*.



**Figura 15.** Necropsia de ejemplares de *D. rotundus* capturados en Hidalgo (izquierda) y Tabasco (derecha).

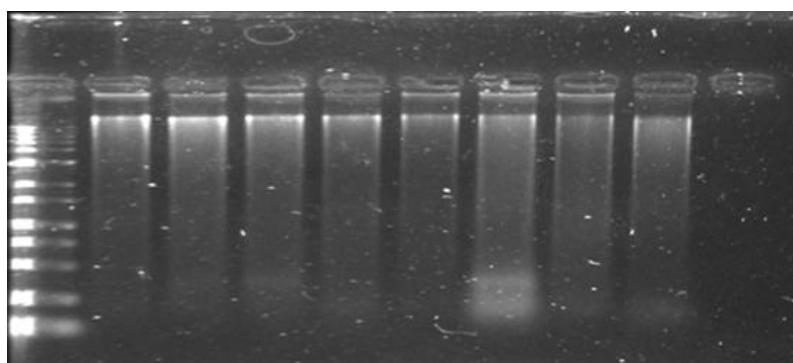
## 7.2. Control de extracción de ácidos nucleicos.

Las concentraciones obtenidas de las extracción de sangre oscilaron entre los 30 ng/ $\mu$ L y 120 ng/ $\mu$ L con una relación 260/280 cercana a 1.8 y 260/230 entre 2 y 2.2, adecuadas para la realización de PCR punto final, semianidado y anidado, para la detección de piroplasmidos.

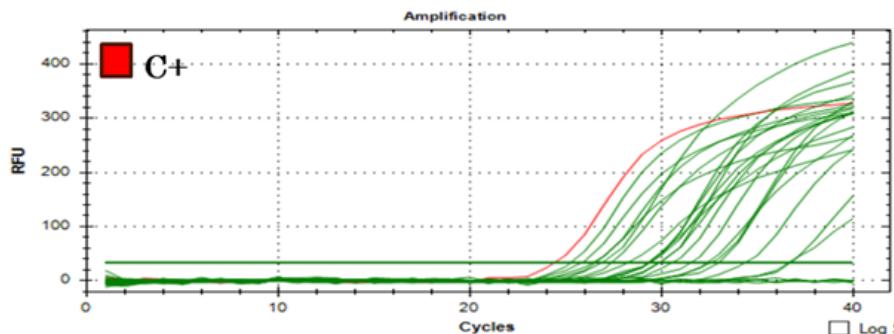


**Figura 16.** Ejemplo de la electroforesis en agarosa al 1% para corroborar la integridad del ADN extraído de sangre, mostrando un patrón electroforético...

Con respecto a las cuantificaciones realizadas al ADN extraído a partir de muestras esplénicas, se obtuvieron concentraciones que oscilaban entre los 7.0 y 31.2 ng/  $\mu$ L de ADN total, con una relación 260/280 cercanos al 1.8 y 260/230 entre 2 y 2.2, indicando las condiciones adecuadas de la muestra para la realización de las reacciones de amplificación para la detección del género *Rickettsia*. 31 de 32 muestras de bazo arrojaron resultados positivos en el PCR tiempo real para la detección del gen endógeno *gapdh*, obteniendo curvas desde los CT 22 al 35. El control positivo amplificó, como era esperado y el control negativo no mostró ninguna señal de amplificación.

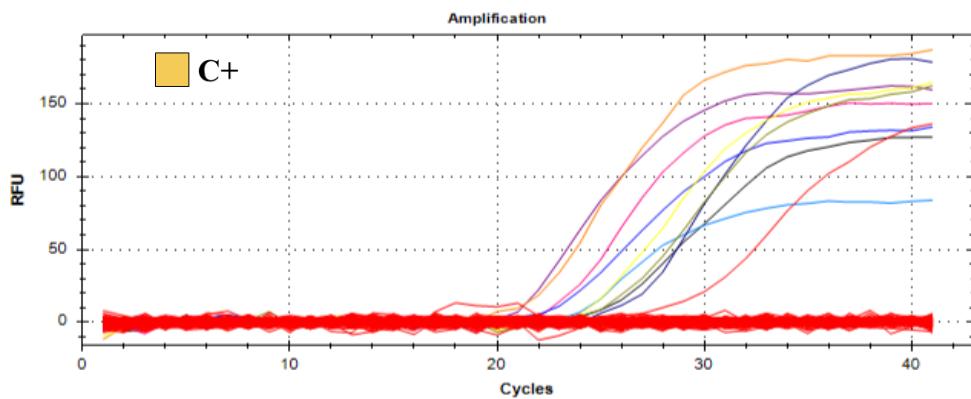


**Figura 17.** Ejemplo del gel de agarosa al 1% realizado para corroborar la integridad del ADN extraído de bazo.



**Figura 18.** Ejemplo de los resultados de RT-PCR para control del gen endógeno *gapdh* de muestras de bazo.

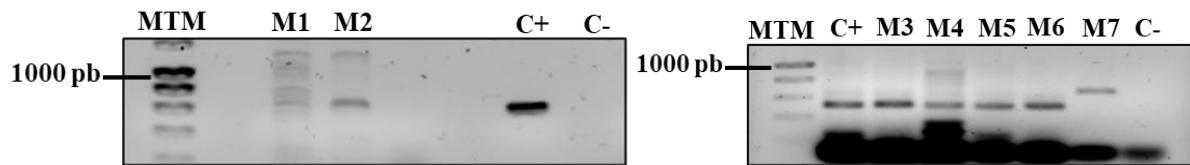
Se obtuvieron resultados positivos para la detección del gen endógeno codificante para *gapdh* en todas las muestras de hígado y bazo (32/32), obteniendo curvas que se elevan a partir de los CTs 20 al 32, el control positivo de hígado murino amplificó como era esperado, y el control negativo permaneció sin mostrar señal.



**Figura 19.** Ejemplo de los resultados de RT-PCR para control del gen endógeno *gapdh* en muestras de hígado.

### 7.3. Detección de Piroplásmidos.

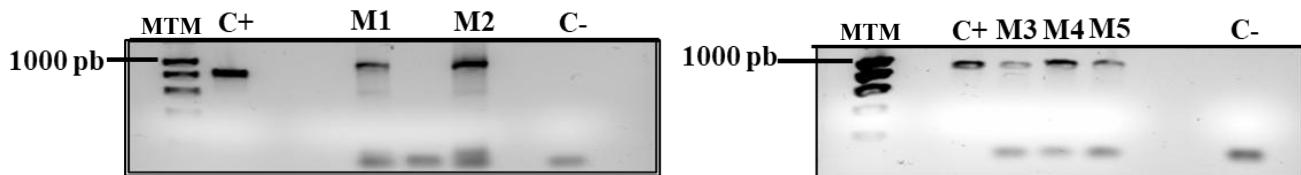
Se obtuvieron 14 de 32 ejemplares (43.75%), 3 procedentes de Hidalgo (9.37%), 2 de Querétaro (6.25%) y 9 ejemplares originarios de Tabasco (28.12%), con resultado positivo a la detección del gen *18S rRNA* del orden Piroplasmida en sangre (Casati *et al.*, 2006).



**Figura 20.** Ejemplo de la amplificación del gen *18S rRNA* de Piroplasmida, obteniendo un amplicón esperado de aproximadamente 425 pb (Casati *et al.*, 2006). **MTM**= marcador de talla molecular (1Kb). **C+**= control positivo. **C-**= control negativo. **M1-7**= muestras.

Las muestras que resultaron positivas en al primer protocolo fueron sometidas al protocolo de PCR anidado propuestos por Mongruel *et al.*, 2022, que amplifica una región del gen *18S rRNA* de los piroplásmidos (Mongruel *et al.*, 2022). De dos de estas muestras,

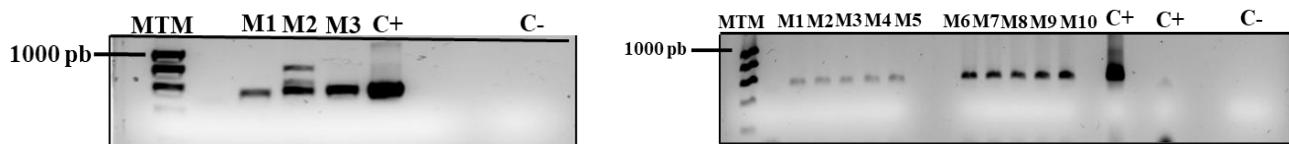
seleccionadas debido a la intensidad de la banda generada en la electroforesis, el amplicón fue purificado y posteriormente fueron enviadas para la realización de secuenciación capilar; sin embargo, ambas secuencias obtenidas fueron sometidas a análisis bioinformático, el cual arrojó un valor del 100% de cobertura e identidad para el gen *18S rRNA* de *Desmodus rotundus*. Por lo que se decidió realizar el tercer protocolo, esta vez de PCR semianidado (Gubbels *et al.*, 1999) a las muestras positivas al primer protocolo, las cuales nuevamente arrojaron resultados positivos. Cabe señalar que en uno de los ejemplares positivos a la detección de piroplásmidos, mostró hepatomegalia evidenciada durante la necropsia y colecta de tejidos.



**Figura 21.** Amplificación del gen 18S rRNA de Piroplásmda, obteniendo un amplicón esperado de aproximadamente 800 pb (Mongruel *et al.*, 2022). **MTM**= marcador de talla molecular (1Kb). **C+**= control positivo. **C-**= control negativo. **M1-5**= Muestras.

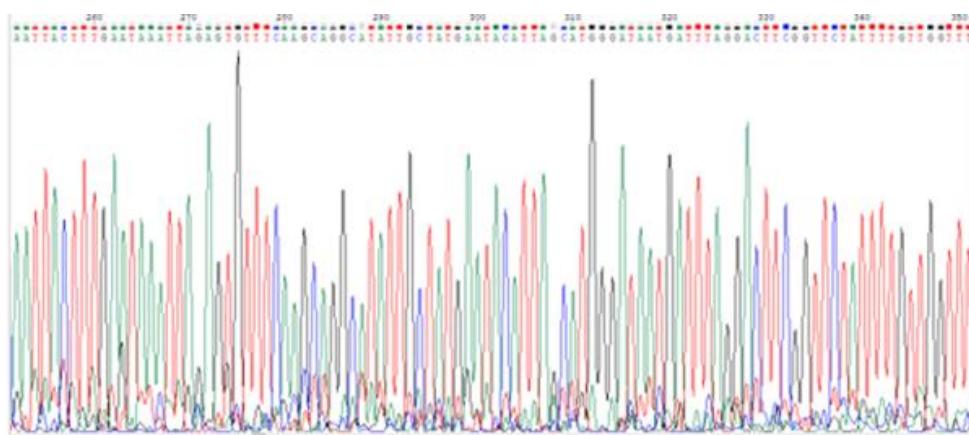
Usando el mismo criterio de la intensidad de banda a la electroforesis, dos de los amplicones obtenidos del tamaño esperado fueron purificados y posteriormente enviados para la realización de secuenciación capilar, una de las secuencias no coincidió con ninguna secuencia del banco de genes; sin embargo, la otra secuencia obtenida perteneciente a una muestra originaria del refugio de Progreso de Obregón mostró un porcentaje de cobertura del 87%, un E value de 0.0 y un porcentaje de identidad de 98.97% con un aislado de un organismo eucariota no cultivado, sin mayor identificación en el banco de genes, cuya referencia es de un trabajo realizado en Brasil titulado: “*Long-term habitat fragmentation is associated with reduced MHC IIB diversity and increased infections in amphibian hosts*” de (Belasen *et al.*, 2019) en el que realizan secuenciación a partir de hisopados cutáneos de ranas de la especie *Thoropa taophora* con la intención de encontrar potenciales organismos parásitos de dicha especie. En dicho estudio se encontraron niveles altos de homología en

secuencias de diferentes organismos eucariotas como algunos hongos y protozoarios específicamente del Phylum Apicomplexa.



**Figura 22.** Amplificación del gen 18S rRNA de Piroplasmida, obteniendo un amplicón esperado de 460-520 pb (Gubbels *et al.*, 1999). **MTM**= marcador de talla molecular (1Kb). **C+**= control positivo. **C-**= control negativo. **M1-10**= muestras.

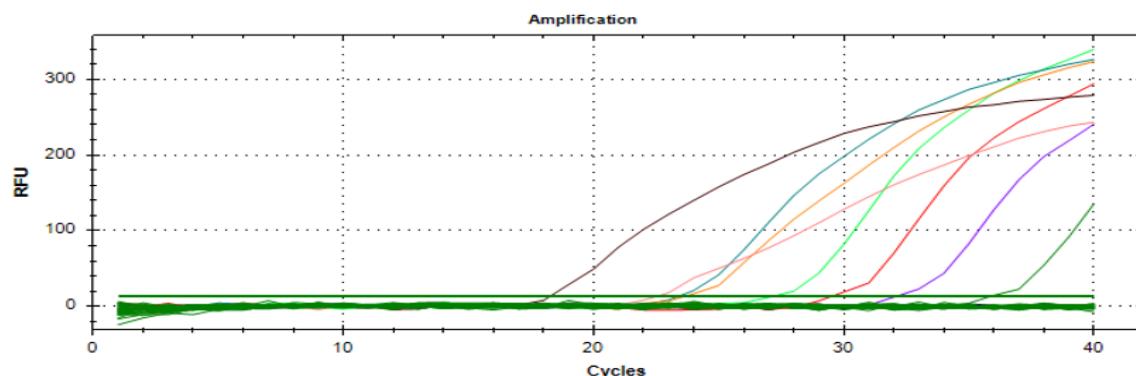
Posteriormente se realizó una búsqueda en el banco de genes por jerarquía taxonómica comenzando a partir del Phylum Apicomplexa, después a las clases Aconoidasida y Conoidasida, al orden Piroplasmida y sus géneros, así como a la familia Eimeriidae con la cual se encuentra un nivel significativo de similitud de la secuencia obtenida con un porcentaje de cobertura del 99%, un valor E de 1e-137 y un porcentaje de identidad del 86.89% con una secuencia de un clon de una muestra ambiental de la familia Eimeriidae cuya referencia es un artículo titulado: “*Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> affects soil microbial diversity associated with trembling aspen*” por (Lesaulnier *et al.*, 2008).



**Figura 23.** Ejemplo del electroferograma obtenido por medio de secuenciación capilar de una de las muestras positivas para los tres protocolos usados para la detección de piroplásmidos

#### 7.4.Detección de *Rickettsia* spp.

Ninguna muestra esplénica resultó positiva a *Rickettsia* spp. Los controles positivos diluidos en serie de  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^7$  mostraron las curvas de amplificación esperadas con valores de CT proporcionales a la concentración del ADN de cada dilución. En contraste, ninguna de las muestras de bazo analizadas presentó señal de amplificación detectable, lo que indica la ausencia de ADN de alguna especie del género *Rickettsia* mediante condiciones experimentales empleadas. Los controles negativos no mostraron amplificación, confirmando la especificidad de la reacción y la ausencia de contaminación.

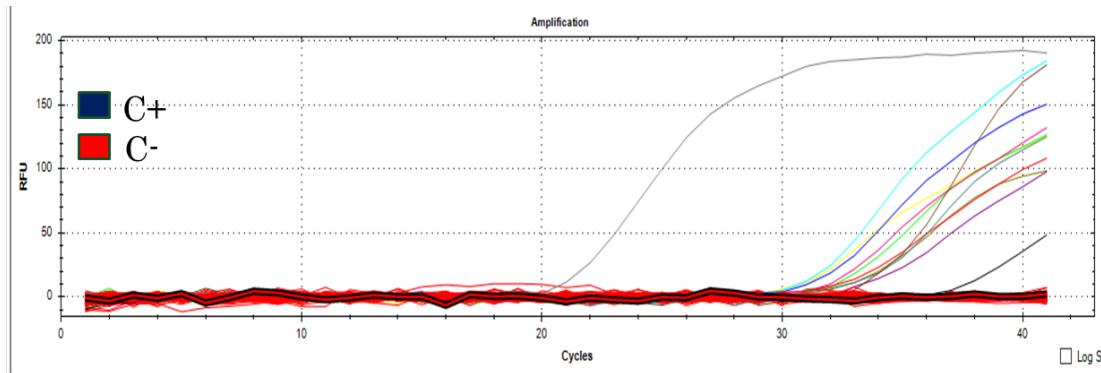


**Figura 24.** Ejemplo de reacción para la detección de *Rickettsia* spp. Se obtuvieron resultados negativos para la amplificación del gen codificante para la proteína OmpB. Se observan curvas de distintos colores indicando la amplificación esperada de los controles.

#### 7.5.Detección de DENV

Se obtuvieron 17 muestras de hígado (53.12%), las cuales arrojaron resultado positivo para DENV-3. De las muestras positivas, 13 correspondieron a ejemplares procedentes del estado de Hidalgo (40.62%) y 4 a ejemplares originarios del estado de Tabasco (12.5%). Se obtuvieron curvas que se elevan a partir de los CT 28 al 36. Los resultados fueron validados por la ausencia de señal en los controles negativos y por la amplificación adecuada de los

controles positivos incluidos en cada corrida. En 4 de los ejemplares positivos a DENV-3 originarios de Progreso de Obregón, se observaron alteraciones durante la necropsia y colecta de tejidos, entre las cuales se encuentran: ictericia en 3 ejemplares, dos de los cuales presentaban hepatomegalia, y otro más presentó los nódulos linfáticos agrandados.



**Figura 25.** Ejemplo de muestras de hígado positivas al protocolo de RT-PCR empleado para la detección de DENV-3.

**Cuadro 16.** Lista de ejemplares capturados y resultados de los análisis moleculares.

ID	Localidad	Estado	Fecha	Sexo	Observaciones	Piroplasmida	Rickettsia	DENV-3
Dr001	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	-
Dr002	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	-
Dr003	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	Ictericia y hepatomegalia	-	-	✓
Dr004	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	Hepatomegalia	-	-	-
Dr005	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr006	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr007	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓

Dr008	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr009	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	✓	-	✓
Dr010	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	✓	-	✓
Dr011	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	-
Dr012	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	Linfadenomegalia	-	-	✓
Dr013	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr014	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	-
Dr015	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	Ictericia y hepatomegalia	-	-	✓
Dr016	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	Ictericia	-	-	-
Dr017	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	Hepatomegalia	✓	-	-
Dr018	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr019	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr020	Progreso de Obregón	Hidalgo	03/02/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr021	Valle Verde	Querétaro	28/02/2024	Hembra	-	✓	-	-
Dr022	Valle Verde	Querétaro	28/02/2024	Macho	-	✓	-	-
Dr443	Poaná	Tabasco	06/06/2024	Macho	-	✓	-	-
Dr636	Poaná	Tabasco	06/06/2024	Macho	-	✓	-	✓
Dr637	Poaná	Tabasco	06/06/2024	Macho	-	-	-	✓
Dr635	Poaná	Tabasco	06/06/2024	Hembra	-	✓	-	-
Dr632	Poaná	Tabasco	06/06/2024	Macho	-	✓	-	-
Dr634	Poaná	Tabasco	06/06/2024	Macho	-	✓	-	-
Dr415	Poaná	Tabasco	06/06/2024	Hembra	-	✓	-	-
Dr723	Poaná	Tabasco	09/06/2024	Macho	-	✓	-	✓
Dr902	Poaná	Tabasco	09/06/2024	Hembra	-	✓	-	-
Dr950	Poaná	Tabasco	09/06/2024	Macho	-	✓	-	✓

### VIII. Discusión

Actualmente no existe ningún reporte sobre la presencia de piroplásmidos en murciélagos hematófagos de México; sin embargo, se han realizado estudios desde finales de 1800 en distintas partes del mundo. El primer trabajo se realizó en Italia con murciélagos vespertilionidos, a los cuales se les analizaron frotis de sangre con estructuras sugerentes a piroplásmidos (de Mello *et al.*, 2023a). Fue hasta 1996 que se realizó el primer trabajo en América, donde se observaron varios estadios de *B. vesperuginis* en extendidos de sangre de *Moormops megalophylla* (Marinkele *et al.*, 1996).

Posteriormente se comenzaron a realizar trabajos de detección molecular con iniciadores basados principalmente en fragmentos del gen *18S rRNA*, Concannon *et al.*, en 2005 realizó el primer trabajo de detección molecular en vespertilionidos de Reino Unido, detectando *B. verperuginis* (Concannon *et al.*, 2005). Posteriormente los siguientes trabajos enfocados en piroplásmidos y murciélagos siguieron realizándose principalmente en Europa encontrando diversas especies de piroplásmidos sin aparente potencial zoonótico, hasta el año 2019 cuando se detectaron secuencias relacionadas con *Babesia microti* en Pteropodiformes de Madagascar (Rainavoson *et al.*, 2019). Los trabajos más recientes realizados en Latinoamérica han demostrado hallazgos importantes detectando molecularmente varias especies de *Babesia* y *Theileria* detectadas a partir de muestras de murciélagos no hematófagos como *Phyllostomus* o *Artibeus*, así como en *Desmodus rotundus*, en los cuales han detectado secuencias de piroplásmidos de otras especies de mamíferos como coatíes, tauritos y tlacuaches (de Mello *et al.*, 2023a).

A pesar de que los protocolos de PCR utilizados en el presente estudio estaban diseñados específicamente para la detección distintos fragmentos del gen *18S rRNA* de protozoarios del orden *Piroplasmida*, los resultados de la secuenciación capilar revelaron la presencia de un organismo perteneciente a la familia *Eimeriidae*. Este hallazgo sugiere que los iniciadores empleados pudieron presentar cierto grado de especificidad limitado, lo que generó la amplificación de regiones homólogas presentes en otros miembros del phylum en cuestión. El análisis del electroferograma derivado de la secuenciación capilar mostró homología con varios organismos de familias presentes a este phylum; sin embargo, los

valores de mayor identidad y cobertura correspondieron a secuencias relacionadas con un organismo eucariota no cultivado y de miembros de la familia *Eimeriidae*.

Cabe destacar que se han realizado varios trabajos en distintas partes del mundo como Japón, Filipinas, España y Norte América, incluido México; en los cuales han sido detectadas varias especies de *Eimeria* spp, algunas de ellas de reciente descubrimiento, involucrando murciélagos vepriliónidos, filostómidos y algunos megaquirópteros (Duszynski *et al.*, 1988; Murakoshi *et al.*, 2016; Couso-Pérez *et al.*, 2022; Benett *et al.*, 2025).

Tales hallazgos mantienen abierta la posibilidad de que el origen del ADN amplificado forme parte de un organismo aún no descrito, asociado a murciélagos hematófagos. Considerando la diversidad del phylum *Apicomplexa* y la existencia de distintos linajes ambientales con información genética parcial en bases de datos, es posible que el organismo detectado represente una variante filogenética nueva o un taxón no caracterizado hasta el momento. Los resultados obtenidos, aunque por sí mismos no confirman una infección activa por algún organismo perteneciente al orden *Piroplasmida*, destacan la necesidad de un análisis más profundo y el uso de otros marcadores para determinar la identidad del organismo detectado, lo cual podría aportar información novedosa sobre la diversidad microbiana asociada a murciélagos hematófagos.

A pesar de haberse empleado una técnica de RT-PCR dirigida a un fragmento del gen que codifica a la proteína OmpB, no se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en las muestras esplénicas analizadas en el presente estudio. Este resultado contrasta con reportes previos en los que se ha documentado la presencia de ADN de *Rickettsia* en tejidos de murciélagos, así como en sus ectoparásitos, en distintas partes del mundo, incluido México (Sánchez-Montes *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2020; Matei *et al.*, 2021; Lugo-Caballero *et al.*, 2021). Dichos resultados sugieren que algunos quirópteros podrían actuar como hospedadores incidentales o como reservorios indirectos mediante la coexistencia con ectoparásitos hematófagos infectados. Sin embargo, en el presente estudio no se obtuvo evidencia molecular que respalde la presencia de *Rickettsia* spp., lo que podría atribuirse a una limitada sensibilidad frente a la diversidad del género, o a la ausencia real de la presencia de material genético en

los individuos muestreados. En ninguno de los ejemplares analizados se detectó la presencia de garapatas lo que, en parte, podría explicar la ausencia de detecciones positivas.

Se obtuvo por primera vez evidencia de la presencia de material genético de DENV-3 en *Desmodus rotundus*. La posibilidad de la participación de los murciélagos en el ciclo biológico de DENV ha sido objeto de debate y controversia desde mediados del siglo pasado. Se han realizado diversos estudios con el objetivo de detectar la presencia de anticuerpos y material genético de varios flavivirus en quirópteros; varios de ellos han sido detectados e incluso aislados, comprobando su infección de manera experimental como es el caso de JEV (Kuno *et al.*, 2001).

Diversos estudios en los 5 continentes han reportado la detección de anticuerpos y ARN viral de distintos serotipos de DENV en varias especies de murciélagos, lo que ha generado hipótesis sobre su rol potencial como reservorios. Otros estudios cuestionan la relevancia epidemiológica de dichos hallazgos al no encontrar indicios de infección o exposición a DENV, argumentando que tales resultados podrían deberse a infecciones transitorias, contaminación, o exposición eventual al virus, sin que esto implique necesariamente un papel activo en las dinámicas de replicación y transmisión del virus (Gwee *et al.*, 2021).

Sin embargo, los hallazgos e hipótesis generadas, aunque relevantes para el área de investigación, no han sido del todo concluyentes debido a las limitaciones metodológicas, la presencia de bajos títulos virales, la posibilidad de reacciones cruzadas de anticuerpos con otros flavivirus, además de la evidencia de escasa actividad replicativa en infecciones experimentales en murciélagos frugívoros del género *Artibeus*. Por lo tanto, la evidencia actual no permite confirmar ni descartar de manera definitiva la capacidad de los murciélagos para mantener infecciones activas o contribuir a la transmisión de DENV (Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2024).

Aunque diversas investigaciones han reportado la detección de anticuerpos contra los 4 serotipos de DENV, la interpretación de dichos resultados debe tomarse con cautela. Por si solos, estos resultados no constituyen evidencia concluyente de que los murciélagos actúen como reservorios competentes, debido a múltiples limitaciones metodológicas y biológicas (Gwee *et al.*, 2021). Un aspecto crítico en estos estudios es la posibilidad de reacciones cruzadas. Dado que los flavivirus comparten determinantes antigenicos altamente

conservados en sus proteínas de envoltura, por lo que las pruebas serológicas pueden detectar anticuerpos que no son específicos contra algún serotipo de DENV, sino contra otros flavivirus estrechamente relacionados. En áreas tropicales, donde se han realizado varios de estos estudios, co-circulan simultáneamente varios flavivirus, por lo que la detección de anticuerpos en suero de quirópteros podría deberse a exposición a varios de estos virus y no necesariamente a una infección por DENV (Gwee *et al.*, 2021; OPS/OMS, 2024).

En lo que respecta a los casos donde se ha realizado la detección de ARN viral, las cargas virales encontradas suelen ser bajas, además de que no existe evidencia de la generación de una viremia suficiente para sostener la transmisión hacia algún vector potencial. Algunos autores han propuesto que la presencia de ARN viral podría deberse a infecciones abortivas o exposiciones transitorias (Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2024).

Asimismo, la detección de ARN viral presente en muestras de tejidos o fluidos de quirópteros tampoco constituye por sí sola, evidencia de una infección productiva. La presencia de material genético podría tener varias explicaciones como la contaminación ambiental, ingestión accidental de mosquitos infectados o por infecciones abortivas en las que el virus ingresa a la célula, pero es incapaz de completar su ciclo de replicación. Para confirmar que un hospedador está realmente infectado es indispensable cumplir con principios básicos de los postulados de Koch lo que consistiría en el aislamiento del virus vivo en cultivo celular, demostrar su replicación en el hospedador sospechoso y reproducir la infección bajo condiciones experimentales en individuos susceptibles. Hasta la fecha, no se ha podido aislar DENV viable ni demostrar replicación sostenida en quirópteros.

Otra condición crítica para que una especie pueda considerarse reservorio competente es la capacidad de desarrollar una viremia suficientemente elevada y sostenida capaz de infectar a los posibles vectores. En el caso concreto de DENV, los mosquitos de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* requieren cargas virales específicas en sangre para volverse infectivos. Los estudios disponibles en murciélagos no han demostrado viremias con tal magnitud; por el contrario, cuando se realiza la detección de ARN, los niveles suelen ser bajos, lo que limita la posibilidad de que los quirópteros mantengan el ciclo de transmisión natural del virus (Vasilakis & Webber, 2008; Lambrechts *et al.*, 2009; Nguyet *et al.*, 2013).

Finalmente, para aseverar el papel de los quirópteros como reservorios en la ecología de DENV, sería necesario realizar estudios de competencia vectorial, en los que se demuestre que mosquitos alimentados a partir de sangre de murciélagos infectados, adquieren el virus y posteriormente son capaces transmitirlo a otro quiróptero susceptible. Hasta ahora, no existen evidencias que documenten tal fenómeno.

Los resultados obtenidos en el presente estudio generan nueva evidencia al detectar la presencia de material genético de DENV-3 por primera vez en muestras de hígado de ejemplares de *D. rotundus* capturados en Hidalgo y Tabasco, lo cual sugiere la posibilidad de una interacción más compleja entre estos mamíferos y el virus, de lo que previamente se había considerado. Si bien, tales hallazgos no permiten confirmar de concluyentemente el papel de *D. rotundus* como reservorio competente, sí refuerzan la necesidad de considerar su potencial participación en el ciclo ecológico de DENV, especialmente en sitios en los cuales coexisten tanto con múltiples organismos que podrían actuar como vectores, así como con potenciales hospedantes susceptibles. Tomando en cuenta la posibilidad de que existan tanto vectores como reservorios aún desconocidos.

Este hallazgo es relevante, debido a que el hígado es reconocido como un órgano blanco en la patogenia del dengue, manteniendo un rol importante como sitio de replicación activa, por lo tanto, la presencia de material genético viral en este órgano plantea la posibilidad de una infección activa, más allá de una simple exposición incidental (Martina & Koraka, 2009).

Por otra parte, tomando en cuenta la alta inestabilidad y susceptibilidad a la degradación que presentan las moléculas de ARN viral ante las nucleasas presentes en los tejidos, la detección de material genético viral en hígado implica la posibilidad de que el virus permanecía protegido dentro de células hipotéticamente infectadas, donde el ARN permanece relativamente estable durante los procesos replicativos, y no se habría preservado si su presencia fuera meramente incidental. La combinación de estos factores refuerza la hipótesis de que los murciélagos hematófagos positivos del presente estudio realmente podrían encontrarse infectados por DENV-3, y no tratarse de un hallazgo incidental o de contaminación. Este hallazgo, por lo tanto, también aporta evidencia a la hipótesis de que los

murciélagos, aun que generalmente se consideran huéspedes incidentales quizá podrían sostener infecciones activas focalizadas en órganos diana primarios, como el hígado (Narayanan & Makino, 2012).

A pesar de no haber realizado la cuantificación directa del ARN viral de DENV-3 detectado en el presente estudio, los CT's en los que comienza la detección van del 30 al 35, lo que permite especular la presencia de escaso material genético, posible reflejo de una infección leve o de carácter crónico (Fuller *et al.*, 2013). La detección de cargas virales bajas en los individuos positivos podría deberse, a la condición fisiológica y la edad aproximada de los ejemplares analizados, los cuales son únicamente murciélagos adultos. Es posible que el virus no se encuentre en una fase de infección aguda, sino crónica en un estado de latencia donde la replicación ocurre de manera limitada y sin signos clínicos. Existe evidencia de que los quirópteros poseen mecanismos inmunitarios característicos y tienen la capacidad de modular la replicación viral. Esta modulación permite que el hospedador limite la replicación sin eliminar completamente al virus, permaneciendo en un equilibrio entre tolerancia inmunológica y control de la infección (O`Shea *et al.*, 2014; Subundhi, 2019; Irving *et al.*, 2021).

Por lo tanto, especulamos que los individuos adultos analizados podrían mantener una replicación viral controlada, con cargas virales bajas pero detectables, lo que explicaría la persistencia del material genético viral en un órgano blanco como lo es el hígado. Por lo que las bajas cargas virales encontradas no descartan infección activa, sino que podrían reflejar un estado de persistencia viral, mediada por mecanismos inmunológicos propios de los murciélagos.

Hasta la fecha, solo tres estudios han abordado directamente la detección de dengue en *D. rotundus*, realizados en México, el publicado por Abundes-gallegos en 2018, otro más publicado por Espinoza-Gómez en el año 2022 y el presente estudio.

Los resultados que obtuvimos guardan una estrecha relación con los obtenidos por Abundes-Gallegos *et al.* (2018) quienes documentaron la presencia de material genético de DENV en mosquitas hematófagas de las especies *Strebla widemanii* (Diptera: Streblidae) y *Trichobius parasiticus* (Diptera; Streblidae), ectoparásitos asociados a *D. rotundus*, así como

en muestras de hígado de ejemplares de la especie en cuestión, a los cuales parasitaban. Estos especímenes fueron capturados en la misma locación de Progreso de Obregón, Hidalgo, en el cual los ejemplares para el presente estudio fueron capturados.

En dicho trabajo se reportó la detección de ARN de DENV-2 en *S. wiedemanii* y *T. parasiticus* e hígados de ejemplares de vampiro común. Dicho hallazgo coincidió con el panorama epidemiológico de aquel periodo, en el cual DENV-1 y DENV-2 eran los serotipos con mayor circulación entre 2014 y 2015, asociado a numerosos brotes en población humana (SINAVE, 2015). En contraste, en el presente trabajo detectamos DENV-3 en muestras de tejido hepático de *D. rotundus* provenientes de Hidalgo y Tabasco. Este resultado posee particular relevancia, debido a que DENV-3 es actualmente el serotipo predominante en México y América Latina, lo que sugiere que *D. rotundus* podría participar de manera indirecta en la dinámica de transmisión del serotipo con mayor prevalencia, posiblemente como consecuencia de su contacto con hospederos infectados. Así mismo Aguilar-Setién y colaboradores, durante 2017 demostraron la susceptibilidad de *S. wiedemanii* por medio de infecciones experimentales.

Desde una perspectiva ecológica, esta coincidencia sugiere que *D. rotundus* podría funcionar como un indicador biológico de la circulación viral en ecosistemas rurales y periurbanos, donde coexisten reservorios humanos y posiblemente reservorios animales desconocidos. Asimismo, la detección de distintos serotipos en momentos y locaciones variables refuerza la hipótesis de que *D. rotundus* podría estar expuesto a los serotipos dominantes en cada ciclo epidémico, reflejando la dinámica temporal y geográfica del virus.

Los autores de tal estudio plantean que la presencia del material genético viral presente en los ectoparásitos de *D. rotundus*, podría explicarse por la ingestión de sangre infectada durante la alimentación del ectoparásito, o bien por contaminación superficial del insecto, sin evidencias que sustenten replicación viral ni en el artrópodo ni en el murciélagos hospedero. Por lo tanto, la presencia de DENV en los ectoparásitos de *D. rotundus* sugiere que estos participan en la dinámica del virus como posibles reservorios en el medio silvestre, con escasa probabilidad de infectar a seres humanos.

La detección en un órgano blanco reconocido del DENV, como el hígado, sugiere un proceso más complejo que la simple exposición pasiva al patógeno o por contaminación,

dado que DENV tiene afinidad por los hepatocitos en los cuales es capaz de replicarse. (Martina & Koraka, 2009). Este hallazgo plantea la posibilidad de una infección sistémica activa o persistente de baja carga viral, coherente con la naturaleza crónica y controlada que se ha descrito para algunas infecciones virales en quirópteros (Subudhi *et al.*, 2019).

Ambos, el presente estudio y el realizado por Abunde-Gallegos y colaboradores, concuerdan en señalar a *D. rotundus* como una especie que potencialmente podría estar involucrada en la ecología de DENV y evidencian la presencia de material genético de DENV asociado a *D. rotundus* en regiones del centro y sureste de México.

En contraste, Espinoza-Gómez y colaboradores, no detectaron DENV en ninguno de los ejemplares analizados, lo que podría atribuirse a diversos factores tales como las diferencias de la ubicación geográfica, estacionalidad, la sensibilidad de los métodos, la especificidad de los iniciadores empleados para la realización de los ensayos, así como tamaño y tipo de muestra.

En el presente estudio se detectaron secuencias correspondientes a DENV-3, lo que contrasta con la ausencia total de detección reportada por Espinoza-Gómez *et al.* (2022). Esta diferencia puede deberse, entre otros factores, a la variación en los tejidos analizados y al periodo temporal de muestreo. Mientras que Espinoza-Gómez *et al.* se enfocaron exclusivamente en muestras de encéfalo, un tejido donde los flavivirus pueden encontrarse solo en fases neurotrópicas y representa un órgano blanco no primario (Li *et al.*, 2017), en este trabajo se incluyeron muestras de tejido hepático, donde la replicación viral puede ser más evidente durante etapas tempranas o subclínicas de la infección (Martina & Koraka, 2009). Además, el estudio previo se realizó entre 2016 y 2017, periodo en el cual predominaba la circulación de DENV-2 en México y el número de casos registrados fue mucho menor que en la epidemia actual (SINAVE, 2018), en la que el serotipo 3 (detectado en el presente estudio) presenta mayor prevalencia tanto en México como en América Latina, lo que podría explicar la diferencia de resultados entre ambos trabajos.

Los resultados negativos del estudio de Espinoza-Gómez *et al.*, coinciden con el decremento de casos de DENV reportados a nivel nacional, suscitado entre 2016 y 2017; sin embargo, durante ese periodo Guanajuato, mostró un 69% de los casos confirmados en

México, el cual fue uno de los sitios de muestreo de dicho estudio (CENAPRECE, 2018; SINAVE, 2018) y no presentó detecciones positivas en las muestras de murciélagos, difiriendo con los resultados del presente estudio en el cual se detectaron muestras positivas provenientes del estado de Hidalgo, una región que no se considera de alta prevalencia en la actualidad. Esto podría indicar que la circulación del virus en poblaciones silvestres no siempre refleja los patrones epidemiológicos humanos, sugiriendo la existencia de ciclos selváticos alternativos. Aunque en Tabasco, donde también se obtuvieron muestras positivas a DENV-3, si fue uno de los estados con mayor prevalencia en 2023 (OPS/OMS, 2024).

La detección de DENV-3 por primera vez en *D. rotundus* genera varias interrogantes respecto a las posibles vías de transmisión del virus hacia estos murciélagos. Una primera hipótesis considera la posibilidad de que vectores conocidos como mosquitos del género *Aedes*, puedan alimentarse de sangre de murciélagos y mediante esta vía sean capaces de transmitir el virus. Aunque las preferencias alimentarias de estos mosquitos se orientan hacia la sangre de los humanos principalmente, no se puede descartar por completo esta interacción, especialmente en áreas con alta densidad de vectores. Existe evidencia de otros flavivirus zoonóticos como el JEV que presentan la capacidad de transmisión vertical y directa entre murciélagos, generan una viremia corta, pero detectable y se ha comprobado la capacidad de mosquitos del género *Culex* de infectarse después de consumir sangre de murciélagos infectados y posteriormente ser capaz de infectar otros murciélagos (Mackenzie *et al.*, 2016).

Una segunda posibilidad es la existencia de vectores alternativos no identificados, capaces de mediar la transmisión de DENV en especies silvestres, incluidos los quirópteros. Esto ha sido sugerido con otros flavivirus, como el WNV y SLEV, donde se ha documentado una diversidad de vectores involucrados (Kuno, 2001). De acuerdo con Abundes-Gallegos (2018), algunas cepas de DENV se encuentran restringidas al medio silvestre, donde diferentes especies de mosquitos, que en su mayoría no se alimentan de humanos cohabitan (Abundes-Gallegos *et al.*, 2018). Además, se ha documentado la infección experimental de ectoparásitos de especies productivas como es el caso de *Melophagus ovinus*, lo que refuerza la hipótesis de la presencia de vectores desconocidos que potencialmente podrían participar

en los ciclos epidemiológicos del DENV en poblaciones silvestres o en animales de abasto (Aguilar-Setién *et al.*, 2017).

Algunos autores han sugerido que, además de la transmisión vectorial clásica, ciertos arbovirus podrían emplear rutas alternativas de infección, incluyendo la vía oral, este tipo de transmisión podría tener relevancia en especies que, por su comportamiento trófico, están en contacto directo con tejidos o fluidos potencialmente infectados, por lo que otra hipótesis considera la vía oral como mecanismo de infección. La dieta de *D. rotundus* ofrece una posible explicación para la detección de DENV-3 en muestras hepáticas. Esta especie se alimenta de la sangre de una amplia gama de presas en su mayoría mamíferos domésticos y silvestres, incluyendo bovinos, equinos, suidos, roedores, marsupiales e incluso humanos en zonas rurales (Aguilar-Setien *et al.*, 1998, Scheffer *et al.*, 2022; Brown & Escobar, 2023). Dada esta diversidad de presas, es factible plantear la hipótesis de que *D. rotundus* podría adquirir el DENV mediante vía oral o entérica, tras alimentarse de un hospedador virémico.

Esta ruta de infección ha sido evidenciada en estudios experimentales con murciélagos insectívoros expuestos por vía oral a mosquitos infectados por flavivirus, como WNV, JEV, YFV y el virus del valle del Rift (RVFV) en los cuales se ha generado evidencia de que la ingestión de presas infectadas puede conducir a la detección de ARN viral y replicación limitada en tejidos del tracto digestivo y órganos viscerales (Kuno, 2001; Sulkın & Allen, 1974). En este sentido, la detección de DENV-3 en hígado podría reflejar una infección adquirida por vía oral, secundaria al consumo de sangre infectada, en lugar de transmisión vectorial clásica del DENV mediada por mosquitos *Aedes*. Se han reportado casos de transmisiones atípicas de DENV por medio de trasplantes, transplacentaria y un caso de posible transmisión directa por exposición mucocutánea de sangre, lo que podría servir como antecedente de la posibilidad de la transmisión mucocutánea u oral por contacto con sangre infectada con DENV (Chen & Wilson, 2015).

De aceptarse esta posibilidad, la presencia de DENV-3 en las muestras *D. rotundus* del presente estudio, podría considerarse un indicador de circulación viral en animales silvestres o domésticos de la región. Esto generaría evidencia sobre la existencia de reservorios no humanos sin identificar, que podrían mantener al virus en ecosistemas rurales o selváticos, permitiendo su reintroducción cíclica a las poblaciones humanas por medio de

los vectores convencionales. Por lo tanto, sería relevante llevar a cabo estudios serológicos y moleculares en las presas habituales de *D. rotundus*, particularmente en zonas donde detectamos muestras positivas, para evaluar la posible circulación de DENV en fauna doméstica y silvestre, lo que permitiría esclarecer si la infección de los murciélagos es incidental o forma parte de un ciclo más complejo que aún no ha sido descrito.

Cabe destacar que, a diferencia de los murciélagos frugívoros, nectarívoros o insectívoros, en los cuales se ha documentado la presencia de flavivirus a través de pruebas moleculares y serológicas, los murciélagos hematófagos han sido menos estudiados en este aspecto, y su papel epidemiológico en las dinámicas de arbovirus zoonóticos es aún incierto. No obstante, la detección de DENV-3 en *D. rotundus* del presente estudio, invita a considerar a esta especie no solo como un hospedero incidental, sino potencialmente como parte del ciclo silvestre de DENV, aunque se requiere mayor evidencia para confirmar su papel como reservorio competente.

Los resultados obtenidos también permiten considerar la posibilidad de infecciones transplacentarias como un mecanismo potencial de mantenimiento viral en las colonias de *D. rotundus*. Así como la participación de ectoparásitos asociados al murciélagos, en la perpetuación del ciclo viral dentro de las colonias. Estos ectoparásitos hematófagos tales como *S. widemanii* y *T. parasiticus* podrían actuar como vectores facilitando la diseminación del virus entre individuos dentro de los refugios. Sin embargo, se requieren estudios adicionales que evalúen la competencia vectorial de dichos organismos.

Los hallazgos de ARN viral de dengue serotipo 3 obtenidos en el presente estudio, podrían estar vinculados a los recientes cambios climáticos registrados en 2024, caracterizados por aumentos significativos en la temperatura y en la duración de la temporada de calor. Dichas condiciones ambientales pueden favorecer la supervivencia y la actividad de vectores incrementando la posibilidad de una mayor circulación de DENV en ambientes donde la incidencia humana de dengue ha sido baja (Bhatia *et al.*, 2022; Bonilla-Aldana *et al.*, 2024). Cabe destacar que el estado de Hidalgo no se encuentra entre los de mayor prevalencia de dengue en México, lo que sugiere que la detección de material genético viral en murciélagos podría reflejar circulación viral en un entorno silvestre o en huéspedes alternativos, independiente de los brotes humanos locales, lo que apoya la hipótesis de que

factores ambientales recientes, junto con la ecología de *D. rotundus*, podrían facilitar la exposición a DENV en áreas con pocos casos reportados.

La detección de DENV-3 en poblaciones de *D. rotundus* con potencial contacto con el ser humano, debido a las actividades ecoturísticas y ganaderas presentes en las zonas de muestreo, representa un hallazgo relevante desde la perspectiva de la salud pública (SINAVE/DGE/SALUD, 2025). Este serotipo ha sido asociado con una mayor probabilidad de cuadros de DG incluso en infecciones primarias, lo que reviste especial interés, ya que las vacunas disponibles actualmente muestran una eficacia limitada frente a DENV-3 (OMS/OPS, 2025). En este contexto, la posible circulación de este serotipo en fauna silvestre sugiere la necesidad de profundizar en la vigilancia epidemiológica para evaluar su papel en la dinámica del virus en México y en las regiones de América Latina donde se distribuye *D. rotundus*.

En conjunto los hallazgos realizados en este estudio abren posibilidades para la investigación sobre la ecología del dengue y la interacción entre virus, vectores y reservorios domésticos y silvestres. Será fundamental la realización de otros estudios de detección con mayores números de muestra y en otras situaciones geográficas; así como infecciones experimentales y otros análisis complementarios, que permitan determinar la frecuencia de infección, viabilidad de la replicación viral, presencia de viremia, rutas de infección, la participación de vectores conocidos y desconocidos; y el riesgo potencial de la transmisión zoonótica.

## IX. Conclusiones

- Las muestras sanguíneas de *D. rotundus*, contienen material genético de un organismo cercano o perteneciente a la familia Eimeriidae.
- Las muestras de tejido esplénico de *D. rotundus* no contienen material genético de *Rickettsia* spp.
- Las muestras de tejido hepático de *D. rotundus* contienen material genético perteneciente al serotipo 3 de DENV.

## X. Referencias

- Abundes-Gallegos, J., Salas-Rojas, M., Galvez-Romero, G., Perea-Martínez, L., Obregón-Morales, C. Y., Morales-Malacara, J. B., ... & Aguilar-Setién, A. (2018). Detection of dengue virus in bat flies (Diptera: Streblidae) of common vampire bats, *Desmodus rotundus*, in Progreso, Hidalgo, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(1), 70-73.
- Afonso, E., & Goydadin, A. (2018). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) guano. *Epidemiology & Infection*, 146(10), 1253-1258.
- Aguilar-Sétien, A., Brochier, B., Tordo, N., De Paz, O., Desmettre, P., Péharpré, D., & Pastoret, P. P. (1998). Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine*, 16(11-12), 1122-1126.
- Aguilar-Setién, A., Campos, Y. L., Cruz, E. T., Kretschmer, R., Brochier, B., & Pastoret, P. P. (2002). Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies virus. *Journal of wildlife diseases*, 38(3), 539-544.
- Aguilar-Setién, A., Romero-Almaraz, M. L., Sánchez-Hernández, C., Figueroa, R., Juárez-Palma, L. P., García-Flores, M. M., ... Ramos, C. (2008). Dengue virus in Mexican bats. *Epidemiology and Infection*, 136(12), 1678-1683.
- Aguilar-Setién, A. A., García, A., Olave, I., Rojas, M., Koldenkova, P., García, M., ... & Marín, C. (2017). Dípteros ectoparásitos hematófagos: ¿reservorios potenciales del virus del dengue? *Gac Med Mex*, 153(Sup 2), S82-S90.
- Aguilar-Setién, A., Salas-Rojas, M., Gálvez-Romero, G., Almazán-Marín, C., Moreira-Soto, A., Alfonso-Toledo, J., ... & Drexler, J. F. (2023). Experimental infection of *Artibeus lituratus* bats and no detection of Zika virus in neotropical bats from French Guiana, Peru, and Costa Rica suggests a limited role of bats in Zika transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(7), e0010439.
- Albanese, M., Di Cuonzo, G., Randazzo, G., Sarihongse, S., & Trlncali, G. (1971). Survey for arbovirus antibodies in domestic animals of western Sicily.
- Allen, R., Taylor, S. K., & Sulkin, S. E. (1970). Studies of arthropod-borne virus infections in Chiroptera. VIII. Evidence of natural St. Louis encephalitis virus infection in bats.
- Alvarez-Londoño, J., Giraldo-Noreña, D. F., Martínez-Sánchez, E. T., Rivera-Páez, F. A., & Matta, N. E. (2024). Molecular survey of *Rickettsia spp.* in ticks infesting wild animals in six departments in Colombia. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 15(6), 102381.

Aranda-Coello, J. M., Hernández-Mijangos, L. A., & Weber, M. (2025). First records of *Phyllostomus hastatus* (Pallas, 1767) (Chiroptera, Phyllostomidae), Greater Spear-nosed Bat, in Mexico. *Check List*, 21(4), 652-657.

Aréchiga-Ceballos, N., Rendón-Franco, E., Muñoz-García, C. I., Olave-Leyva, I., & Aguilar-Setién, A. (2024). Dengue and Zika flaviviruses in bats. *Therya Notes*, 5, 112-118.

Ávila-Vargas, L., Soler-Tovar, D., Dong, Q., & Escobar, L. E. (2025). Anticoagulants for the Control of the Common Vampire Bat (*Desmodus rotundus*). *Zoonoses and Public Health*, 72(2), 101-116.

Barnard, T. R., Abram, Q. H., Lin, Q. F., Wang, A. B., & Sagan, S. M. (2021). Molecular determinants of flavivirus virion assembly. *Trends in biochemical sciences*, 46(5), 378-390.

Barrantes Murillo, D. F., Piche-Ovares, M., Gamboa-Solano, J. C., Romero, L. M., Soto-Garita, C., Alfaro-Alarcón, A., & Corrales-Aguilar, E. (2022). Serological Positivity against Selected Flaviviruses and Alphaviruses in Free-Ranging Bats and Birds from Costa Rica Evidence Exposure to Arboviruses Seldom Reported Locally in Humans. *Viruses*, 14(1), 93. <https://doi.org/10.3390/v14010093>

Barrón-Rodríguez, R. J., Parra-Laca, R., Rojas-Anaya, E., Romero-Espinoza, J. Á., Ayala-Sumuano, J. T., Vázquez-Pérez, J. A., ... & Loza-Rubio, E. (2022). Evidence of viral communities in three species of bats from rural environment in México. *Acta Chiropterologica*, 24(1), 249-264.

Beck, C., Leparc-Goffart, I., Desoutter, D., Debergé, E., Bichet, H., Lowenski, S., ... & Lecollinet, S. (2019). Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on French Pacific Islands. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(2), e0007162.

Belasen, A. M., Bletz, M. C., Leite, D. D. S., Toledo, L. F., & James, T. Y. (2019). Long-term habitat fragmentation is associated with reduced MHC IIB diversity and increased infections in amphibian hosts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 236.

Bennett, A. J., Suski, C. D., & O'keefe, J. M. (2025). Molecular epidemiology of *Eimeria* spp. parasites and the faecal microbiome of Indiana bats (*Myotis sodalis*): a non-invasive, multiplex metabarcode survey of an endangered species. *Microbial genomics*, 11(2), 001358.

Bhatia, S., Bansal, D., Patil, S., Pandya, S., Ilyas, Q. M., & Imran, S. (2022). A Retrospective Study of Climate Change Affecting Dengue: Evidences,

Challenges and Future Directions. *Frontiers in public health*, 10, 884645. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.884645>

Biodiversity Research Institute (2022). Bat Field Sampling Methods Collection of Tissues for Mercury Analysis. BRI.

Bittar, C., Machado, R. R., Comelis, M. T., Bueno, L. M., Morielle-Versute, E., Beguelini, M. R., ... & Rahal, P. (2018). Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. *PLoS One*, 13(11), e0207010.

Blanda, V., D'Agostino, R., Giudice, E., Randazzo, K., La Russa, F., Villari, S., ... & Torina, A. (2020). New real-time PCRs to differentiate *Rickettsia spp.* and *Rickettsia conorii*. *Molecules*, 25(19), 4431.

Blitvich, B. J., & Firth, A. E. (2017). A review of flaviviruses that have no known arthropod vector. *Viruses*, 9(6), 154.

Bonilla-Aldana, D. K., Rodas-Fuenmayor, M. M., Ruiz-Aristizabal, L. M., Ulloque-Badaracco, J. R., Alarcón-Braga, E. A., Hernandez-Bustamante, E. A., ... & Rodriguez-Morales, A. J. (2024). Serological and molecular detection of dengue virus in animals: A systematic review and meta-analysis. *Le Infezioni in Medicina*, 32(2), 183.

Bracamonte, J. C. (2018). Protocolo de muestreo para la estimación de la diversidad de murciélagos con redes de niebla en estudios de ecología. *Ecología austral*, 28(2), 446-454.

Brinton, M. A., & Basu, M. (2015). Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus *Flavivirus*. *Virus research*, 206, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.006>

Brown, N., & Escobar, L. E. (2023). A review of the diet of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in the context of anthropogenic change. *Mammalian Biology*, 103(4), 433-453.

Byk, L. A., & Gamarnik, A. V. (2016). Properties and functions of the dengue virus capsid protein. *Annual review of virology*, 3(1), 263-281.

Cabrera-Romo, S., Max Ramirez, C., Recio-Tótoro, B., Tolentino-Chi, J., Lanz, H., Del Angel, R. M., ... & Ludert, J. E. (2016). No evidence of dengue virus infections in several species of bats captured in central and southern Mexico. *Zoonoses and public health*, 63(8), 579-583.

Calderon, A., Guzman, C., Salazar-Bravo, J., Figueiredo, L. T., Mattar, S., & Arrieta, G. (2016). Viral zoonoses that fly with bats: a review.

Caamal-Itza, A. I., Santos-Dzib, C. A., Ramón-García, L. E., Gutiérrez-Cedillo, V., Danis-Lozano, R., Puerto-Manzano, F. I., & Dzul-Rosado, K. R. (2025). Previniendo las rickettsiosis en México: importancia del material de promoción de la salud. *salud pública de México*, 67(2), 190-197.

Casati, S., Sager, H., Gern, L., & Piffaretti, J. C. (2006). Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 13(1).

Castro, A., Tempea, G., & Guglielmino, S. (1976). Incidence of arbovirus antibodies in bovine, ovine and human sera collected in Eastern Sicily. *Acta Virologica*, 20(1), 76-79.

Catenacci, L. S., Ferreira, M., Martins, L. C., De Vleeschouwer, K. M., Cassano, C. R., Oliveira, L. C., ... & Travassos da Rosa, E. S. (2018). Surveillance of arboviruses in primates and sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. *EcoHealth*, 15, 777-791.

Charles, J., Tangudu, C. S., Nunez-Avellaneda, D., Brault, A. C., & Blitvich, B. J. (2021). The host range restriction of bat-associated no-known-vector flaviviruses occurs post-entry. *Journal of General Virology*, 102(9), 001647. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8567430/>

Chen, R., Mukhopadhyay, S., Merits, A., Bolling, B., Nasar, F., Coffey, L. L., ... & ICTV Report Consortium, N. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, 99(6), 761-762. Recuperado de: <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae>

Chen, L. H., & Wilson, M. E. (2005). Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerging infectious diseases*, 11(5), 775.

Chew, B. L. A., Pan, Q., Hu, H., & Luo, D. (2024). Structural Biology of Flavivirus NS1 Protein and Its Antibody Complexes. *Antiviral Research*, 105915.

Choi, C. S., & Lee, Y. T. (1996). Seroepidemiological survey of *Rickettsia* in rodents and bats. *대한미생물학회지*, 31(3), 367-372.

CENAPRCE (2018). INFORME DE DESEMPEÑO, 2017.

Cicuttin, G. L., De Salvo, M. N., La Rosa, I., & Dohmen, F. E. G. (2017). *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp. in *Tadarida brasiliensis*

bats from Buenos Aires, Argentina. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 52, 1-5.

Cigarroa-Toledo, N., Talavera-Aguilar, L. G., Baak-Baak, C. M., García-Rejón, J. E., Hernandez-Betancourt, S., Blitvich, B. J., & Machain-Williams, C. (2016). Serologic evidence of flavivirus infections in peridomestic rodents in Merida, Mexico. Journal of Wildlife Diseases, 52(1), 168-172.

Concannon, R., Wynn-Owen, K., Simpson, V. R., & Birtles, R. J. (2005). Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. Parasitology, 131(4), 489-496.

Cooper, L. N., Ansari, M. Y., Capshaw, G., Galaxyuk, A., Lauer, A. M., Moss, C. F., ... & Orman, R. (2024). Bats as instructive animal models for studying longevity and aging. Annals of the New York Academy of Sciences.

Cordero, V. S., Botello, F., Martínez, J. J. F., Rodríguez, R. A. G., Guevara, L., Granados, G. G., & Moreno, Á. R. (2014). Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 85, 27.

Corduneanu, A., Hrazdilová, K., Sándor, A. D., Matei, I. A., Ionică, A. M., Barti, L., ... & Mihalca, A. D. (2017). *Babesia vesperuginis*, a neglected piroplasmid: new host and geographical records, and phylogenetic relations. Parasites & vectors, 10(1), 598.

Cousó-Pérez, S., Pardavila, X., Ares-Mazás, E., & Gómez-Cousó, H. (2022). Molecular identification of *Eimeria* species in Spanish bats. Parasitology International, 91, 102621.

D'Auria, S. R. N., Camargo, M. C. G., Pacheco, R. C., Savani, E. S. M. M., Dias, M. A. G., da Rosa, A. R., ... & Labruna, M. B. (2010). Serologic survey for rickettsiosis in bats from São Paulo city, Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 10(5), 459-463.

Darras, K. F. A., Yusti, E., Huang, J. C., Zemp, D. C., Kartono, A. P., & Wanger, T. C. (2021). Bat point counts: A novel sampling method shines light on flying bat communities. Ecology and evolution, 11(23), 17179–17190.

Delpietro, H. A., Russo, R. G., Carter, G. G., Lord, R. D., & Delpietro, G. L. (2017). Reproductive seasonality, sex ratio and philopatry in Argentina's common vampire bats. Royal Society open science, 4(4), 160959.

de Mello, V. V. C., Calchi, A. C., de Oliveira, L. B., Coelho, T. F. S. B., Lee, D. A. B., Franco, E. O., Machado, R. Z., et al. (2023a). Molecular Survey of Piroplasmids and Hemosporidians in Vampire Bats, with Evidence of Distinct

Piroplasmida Lineages Parasitizing *Desmodus rotundus* from the Brazilian Amazon. *Parasitologia*, 3(3), 248–259.

de Mello, V. V. C., Placa, A. J. V., Lee, D. A. B., Franco, E. O., Lima, L., Teixeira, M. M., ... & André, M. R. (2023b). Molecular detection of blood-borne agents in vampire bats from Brazil, with the first molecular evidence of *Neorickettsia* sp. in *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata*. *Acta Tropica*, 244, 106945.

Denison, M. R. (2008). Seeking membranes: positive-strand RNA virus replication complexes. *PLoS biology*, 6(10), e270.

De Oliveira-Filho, E. F., Oliveira, R. A. S., Ferreira, D. R. A., Laroque, P. O., Pena, L. J., Valença-Montenegro, M. M., ... & Gil, L. H. V. G. (2018). Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. *Transboundary and emerging diseases*, 65(4), 1094-1097.

De Silva, A. M., Dittus, W. P., Amerasinghe, P. H., & Amerasinghe, F. P. (1999). Serologic evidence for an epizootic dengue virus infecting toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 300-306.

De Thoisy, B., Dussart, P., & Kazanji, M. (2004). Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(7), 409-412.

De Thoisy, B. D., Lacoste, V., Germain, A., Muñoz-Jordán, J., Colón, C., Mauffrey, J. F., ... & Lavergne, A. (2009). Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(2), 157-170.

Duszynski, D. W., Reduker, D. W., & Parker, B. B. (1988). Eimeria from bats of the world. II. A new species in *Tadarida femorosacca* from Sonora, Mexico. *The Journal of parasitology*, 317-321.

Diallo, M., Ba, Y., Sall, A. A., Diop, O. M., Ndione, J. A., Mondo, M., ... & Mathiot, C. (2003). Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999–2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerging infectious diseases*, 9(3), 362.

Dietrich, M., Tjale, M. A., Weyer, J., Kearney, T., Seemark, E. C., Nel, L. H., ... & Markotter, W. (2016). Diversity of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. in bats and their blood-feeding ectoparasites from South Africa and Swaziland. *PLoS One*, 11(3), e0152077.

Do Amaral, R. B., Lourenco, E. C., Famadas, K. M., Garcia, A. B., Machado, R. Z., & Andre, M. R. (2018). Molecular detection of *Bartonella spp.* and *Rickettsia spp.* in bat ectoparasites in Brazil. *PLoS One*, 13(6), e0198629.

Doherty, R. L., Carley, J. G., Mackerras, M. J., & Marks, E. N. (1963). Studies of arthropod-borne virus infections in Queensland: Isolation and characterization of virus strains from wild-caught mosquitoes in North Queensland. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 41(1), 17-39.

Dolz, G., Chaves, A., Gutiérrez-Espeleta, G. A., Ortiz-Malavasi, E., Bernal-Valle, S., & Herrero, M. V. (2019). Detection of antibodies against flavivirus over time in wild non-human primates from the lowlands of Costa Rica. *PLoS One*, 14(7), e0219271.

Duan, X., Lu, X., Li, J., & Liu, Y. (2008). Novel binding between pre-membrane protein and vacuolar ATPase is required for efficient dengue virus secretion. *Biochemical and biophysical research communications*, 373(2), 319-324.

Eastwood, G., Sang, R. C., Guerbois, M., Taracha, E. L., & Weaver, S. C. (2017). Enzootic circulation of chikungunya virus in East Africa: Serological evidence in non-human Kenyan primates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 97(5), 1399.

Ellison, L. E., Valdez, E. W., Cryan, P. M., O'Shea, T. J., & Bogan, M. A. (2013). Standard operating procedure for the study of bats in the field. FORT IACUC SOP, 1.

El Khoury, M. Y., Hull, R. C., Bryant, P. W., Escuyer, K. L., St George, K., Wong, S. J., ... & Wormser, G. P. (2013). Diagnosis of acute deer tick virus encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 56(4), 40-47.

Epstein, J. H., Quan, P. L., Briese, T., Street, C., Jabado, O., Conlan, S., ... & Lipkin, W. I. (2010). Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old world frugivorous bats (*Pteropus giganteus*) in Bangladesh. *PLoS pathogens*, 6(7), e1000972.

Eshar, D., & Weinberg, M. (2010). Venipuncture in bats. *Lab animal*, 39(6), 175–176.

Espinoza-Gómez, A., Moreno-Santillán, D. D., Juárez-Maldonado, R., Gutiérrez, E. G., Salazar, M. I., Alonso-Palomares, L. A., ... & Ortega, J. (2022). Identification of viral RNA sequences in vampire bats (*Desmodus rotundus*) from central Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 93.

Fagbami, A. H., Monath, T. P., & Fabiyi, A. (1977). Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(1), 60-65.

Fagre, A. C., & Kading, R. C. (2019). Can bats serve as reservoirs for arboviruses? *Viruses*, 11(3), 215.

Fisher, R., Lustig, Y., Sklan, E. H., & Schwartz, E. (2023). The role of NS1 protein in the diagnosis of flavivirus infections. *Viruses*, 15(2), 572.

Flores-Crespo, R. (1992). El mundo de los vampiros. Crónica de una investigación. México DF: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 1-163.

Franco Filho, L. C., Barata, R. R., Coelho, M. S., Cardoso, J. F., da Silva Lemos, P., Dos Reis, H. S., ... & Nunes, M. R. T. (2023). Genome sequencing of dengue virus serotype 4 in a bat brain sample (*Platyrrhinus helleri*) from the Brazilian Amazon. *Infection, Genetics and Evolution*, 109, 105407.

Fuller, J. A., Njenga, M. K., Bigogo, G., Aura, B., Ope, M. O., Nderitu, L., ... & Feikin, D. R. (2013). Association of the CT values of real-time PCR of viral upper respiratory tract infection with clinical severity, Kenya. *Journal of medical virology*, 85(5), 924-932.

Garbino, G. S., Hernández-Canchola, G., León-Paniagua, L., & Tavares, V. D. C. (2024). A new Mexican endemic species of yellow-eared bat in the genus *Vampyressa* (Phyllostomidae, Stenodermatinae). *Journal of Mammalogy*, 105(3), 563-576.

Ghosh, S. N., Rajagopalan, P. K., Singh, G. K., & Bhat, H. R. (1975). Serological evidence of arbovirus activity in birds of KFD epizootic-epidemic area, Shimoga district, Karnataka, India.

Goncalves, F., Galetti, M., & Streicker, D. G. (2021). Management of vampire bats and rabies: a precaution for rewilding projects in the Neotropics. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 19(1), 37-42.

Goodwin, G. G., & A. M. Greenhall. (1961). A review of the bats of Trinidad and Tobago: Descriptions, Rabies Infection and Ecology. *Bull. Arner. Mus. Nat. Hist.*, 122:191-301.

Greenhall, A. M., Joermann G. & Schmidt U. (1983). *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species*, 202, 1-6.

Gubbels, J. M., De Vos, A. P., Van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L. M., De Vries, E., & Jongejan, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1782-1789.

Guo, L., Li, B., Han, P., Dong, N., Zhu, Y., Li, F., ... & Zhang, Y. (2023). Identification of a Novel *Hepacivirus* in Southeast Asian Shrew (*Crocidura fuliginosa*) from Yunnan Province, China. *Pathogens*, 12(12), 1400.

Gwee, S. X. W., St John, A. L., Gray, G. C., & Pang, J. (2021). Animals as potential reservoirs for dengue transmission: A systematic review. *One Health*, 12, 100216.

Han, H. J., Liu, J. W., Wen, H. L., Qin, X. R., Zhao, M., Wang, L. J., ... & Yu, X. J. (2018). *Babesia vesperuginis* in insectivorous bats from China. *Parasites & Vectors*, 11(1), 317.

Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: a minireview. *Viruses*, 12(8), 829.

Hayman, D. T. (2016). Bats as viral reservoirs. *Annual review of virology*, 3, 77-99.

He, K., Liu, Q., Xu, D. M., Qi, F. Y., Bai, J., He, S. W., ... & Shi, P. (2021). Echolocation in soft-furred tree mice. *Science*, 372(6548), eaay1513.

Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution*, 3(1), 19-28.

Hornok, S., Meli, M. L., Gönczi, E., Halász, E., Takács, N., Farkas, R., & Hofmann-Lehmann, R. (2014). Occurrence of ticks and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sl in three types of urban biotopes: forests, parks and cemeteries. *Ticks and tick-borne diseases*, 5(6), 785-789.

Hornok, S., Estók, P., Kováts, D., Flaisz, B., Takács, N., Szőke, K., ... & Sprong, H. (2015). Screening of bat faeces for arthropod-borne apicomplexan protozoa: *Babesia canis* and *Besnoitia besnoiti*-like sequences from Chiroptera. *Parasites & Vectors*, 8, 1-6.

Hornok, S., Szőke, K., Kováts, D., Estok, P., Görföl, T., Boldogh, S. A., ... & Sándor, A. D. (2016). DNA of piroplasms of ruminants and dogs in ixodid bat ticks. *PLoS One*, 11(12), e0167735.

Hornok, S., Szőke, K., Görföl, T., Földvári, G., Tu, V. T., Takács, N., ... & Wang, Y. (2017). Molecular investigations of the bat tick *Argas vespertilionis* (Ixodida:

Argasidae) and *Babesia vesperuginis* (Apicomplexa: Piroplasmida) reflect “bat connection” between Central Europe and Central Asia. Experimental and Applied Acarology, 72(1), 69-77.

Hornok, S., Szőke, K., Meli, M.L. et al. (2019) Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New Worlds. Parasites Vectors 12, 50

Ikeda, P., Menezes, T. R., Torres, J. M., de Oliveira, C. E., Lourenço, E. C., Herrera, H. M., ... & André, M. R. (2021). First molecular detection of piroplasmids in non-hematophagous bats from Brazil, with evidence of putative novel species. Parasitology Research, 120(1), 301-310.

Inoue, S., Morita, K., Matias, R. R., Tuplano, J. V., Resuello, R. R. G., Candelario, J. R., ... & Natividad, F. F. (2003). Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. Journal of medical primatology, 32(2), 89-94.

Irving, A. T., Rozario, P., Kong, P. S., Luko, K., Gorman, J. J., Hastie, M. L., ... & Wang, L. F. (2020). Robust dengue virus infection in bat cells and limited innate immune responses coupled with positive serology from bats in IndoMalaya and Australasia. Cellular and Molecular Life Sciences, 77, 1607-1622.

Irving, A. T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D. E., & Wang, L. F. (2021). Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. Nature, 589(7842), 363-370.

Kading, R. C., Borland, E. M., Cranfield, M., & Powers, A. M. (2013). Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo basin. Journal of wildlife diseases, 49(3), 587-599.

Kading, R. C., & Schountz, T. (2016). Flavivirus Infections of Bats: Potential Role in Zika Virus Ecology. The American journal of tropical medicine and hygiene, 95(5), 993-996.

Kading, R. C., Kityo, R. M., Mossel, E. C., Borland, E. M., Nakayiki, T., Nalikka, B., ... & Miller, B. R. (2018). Neutralizing antibodies against flaviviruses, Babanki virus, and Rift Valley fever virus in Ugandan bats. Infection ecology & epidemiology, 8(1), 1439215.

Kalimuddin, M. D., Narayan, K. G., & Choudhary, S. P. (1982). Serological evidence of Japanese encephalitis virus activity in Bihar. International journal of zoonoses, 9(1), 39-44.

Kato, F., Ishida, Y., Kawagishi, T., Kobayashi, T., Hishiki, T., Miura, T., & Igarashi, T. (2013). Natural infection of cynomolgus monkeys with dengue virus occurs in epidemic cycles in the Philippines. *Journal of General Virology*, 94(10), 2202-2207.

Kaul, H. N., Venkateshan, C. N., Mishra, A. C., Modi, G. B., & Ghosh, S. N. (1976). Serological evidence of arbovirus activity in birds and small mammals in Japanese encephalitis affected areas of Bankura district, West Bengal.

Kemenesi, G., & Bányai, K. (2018). Tick-Borne Flaviviruses, with a Focus on Powassan Virus. *Clinical microbiology reviews*, 32(1), e00106-17.

Kilbourn, A.M., et al., Health evaluation of free-ranging and semi-captive orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. *J Wildl Dis*, 2003. 39(1): p. 73-83

Kosen, L. (1958). Observations on the Epidemiology of Dengue in Panama.

Kostyuchenko, V. A., Zhang, Q., Tan, J. L., Ng, T. S., & Lok, S. M. (2013). Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. *Journal of virology*, 87(13), 7700-7707.

Kuno, G. (2001). Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. *Acta Virologica*, 45(3), 139–150.

Kunz, T.H. & Kurta, A. (1988). Capture methods and holding devices. Ecological and behavioral methods for the study of bats (T. H Kunz ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 1-30.

Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina, UASLP (2017a). Wild bat & rodent capture, handling and fieldwork.

Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina, UASLP (2017b). Wild bat & rodent necropsy and sample collection.

Lanciotti, R. S., Lewis, J. G., Gubler, D. J., & Trent, D. W. (1994). Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *Journal of General Virology*, 75(1), 65-75.

Latanova, A., Starodubova, E., & Karpov, V. (2022). Flaviviridae nonstructural proteins: the role in molecular mechanisms of triggering inflammation. *Viruses*, 14(8), 1808.

Lee, H. L., & Rohani, A. (2005). Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia.

Lesaulnier, C., Papamichail, D., McCorkle, S., Ollivier, B., Skiena, S., Taghavi, S., ... & Van Der Lelie, D. (2008). Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environmental Microbiology*, 10(4), 926-941.

Li, G. H., Ning, Z. J., Liu, Y. M., & Li, X. H. (2017). Neurological manifestations of dengue infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 449.

Linhart, P., Bandouchova, H., Zukal, J., Votýpka, J., Baláž, V., Heger, T., ... & Pikula, J. (2022). Blood parasites and health status of hibernating and non-hibernating noctule bats (*Nyctalus noctula*). *Microorganisms*, 10(5), 1028.

Liu, Y., Guan, W., & Liu, H. (2023). Subgenomic Flaviviral RNAs of Dengue Viruses. *Viruses*, 15(12), 2306.

Liu, Z., Liu, Q., Wang, H., & Yao, X. (2024). Severe zoonotic viruses carried by different species of bats and their regional distribution. *Clinical Microbiology and Infection*, 30(2), 206-210.

Loach, T. R., Narayan, K. G., & Choudhary, S. P. (1983). Serological evidence of persistence of Japanese encephalitis virus activity in Bihar, India. *International Journal of Zoonoses*, 10(1), 7-14.

López-Cuamatzi, I. L., Ortega, J., Ospina-Garcés, S. M., Zúñiga, G., & MacSwiney G, M. C. (2024). Molecular and morphological data suggest a new species of big-eared bat (Vespertilionidae: *Corynorhinus*) endemic to northeastern Mexico. *Plos one*, 19(2), e0296275.

Lugo-Caballero, C., Torres-Castro, M., López-Ávila, K., Hernández-Betancourt, S., Noh-Pech, H., Tello-Martín, R., Puerto-Manzano, F., & Dzul-Rosado, K. (2021). Molecular identification of zoonotic *Rickettsia* species closely related to *R. typhi*, *R. felis*, & *R. rickettsii* in bats from Mexico. *The Indian journal of medical research*, 154(3), 536–538.

Lv, J., Fernández de Marco, M. D. M., Goharriz, H., Phipps, L. P., McElhinney, L. M., Hernández-Triana, L. M., ... & Johnson, N. (2018). Detection of tick-borne bacteria and babesia with zoonotic potential in *Argas (Carios) vespertilionis* (Latreille, 1802) ticks from British bats. *Scientific Reports*, 8(1), 1865.

Machain-Williams, C., López-Uribe, M., Talavera-Aguilar, L., Carrillo-Navarrete, J., Vera-Escalante, L., Puerto-Manzano, F., ... Loroño-Pino, M. A. (2013). Serologic Evidence of Flavivirus Infection in Bats in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(3), 684–689. doi:10.7589/2012-12-318

- Mackenzie, J. S., Childs, J. E., Field, H. E., Wang, L. F., & Breed, A. C. (2016). The role of bats as reservoir hosts of emerging neuroviruses. In *Neurotropic Viral Infections: Volume 2: Neurotropic Retroviruses, DNA Viruses, Immunity and Transmission* (pp. 403-454). Cham: Springer International Publishing.
- Mall, M. P., Kumar, A. S. H. O. K., & Malik, S. V. (1995). Sero-positivity of domestic animals against Japanese encephalitis in Bareilly area, UP. *The Journal of communicable diseases*, 27(4), 242-246.
- Mammal Diversity Database. (2024). Mammal Diversity Database (1.13) [Data set]. Zenodo.
- Marinkelle, C. J. (1996). *Babesia sp.* in Colombian bats (Microchiroptera). *Journal of wildlife diseases*, 32(3), 534.
- Martina, B. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 564-581.
- Matei, I. A., Corduneanu, A., Sándor, A. D., Ionică, A. M., Panait, L., Kalmár, Z., ... & Mihalca, A. D. (2021). *Rickettsia spp.* in bats of Romania: high prevalence of *Rickettsia monacensis* in two insectivorous bat species. *Parasites & vectors*, 14(1), 107.
- Medellín, R. A., Arita, H. T., & Sánchez, O. (1997). Identificación de los murciélagos de México: Clave de campo.
- Meshram, D. D., Fanutti, C., Pike, C. V. S., & Coussons, P. J. (2024). Membrane Association of the Short Transglutaminase Type 2 Splice Variant (TG2-S) Modulates Cisplatin Resistance in a Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line. *Current issues in molecular biology*, 46(5), 4251–4270.
- Messenger S. L., Smith J. S. & Rupprecht C. E. (2002). Emerging epidemiology of bat-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States. *Clinical Infectious Disease*, 35, 738–747.
- Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., ... & Hay, S. I. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in microbiology*, 22(3), 138-146.
- Mills, J. N., Childs, J. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J., & Velleca, W. M. (1995). Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing.
- Mlera, L., & Bloom, M. E. (2018). The role of mammalian reservoir hosts in tick-borne flavivirus biology. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 298.

Molina-Hoyos, Katterine, Montoya-Ruiz, Carolina, Díaz, Francisco J., & Rodas, Juan David. (2018). Enfermedades virales transmitidas por garrapatas. *Iatreia*, 31(1), 36-50.

Mongruel, A. C. B., Medici, E. P., da Costa Canena, A., Calchi, A. C., Perles, L., Rodrigues, B. C. B., ... & André, M. R. (2022). *Theileria terrestris* nov. sp.: a novel *Theileria* in lowland tapirs (*Tapirus terrestris*) from two different biomes in Brazil. *Microorganisms*, 10(12), 2319.

Morales, M. A., Fabbri, C. M., Zunino, G. E., Kowalewski, M. M., Luppo, V. C., Enría, D. A., ... & Calderón, G. E. (2017). Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, dengue, Saint Louis encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and yellow fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of northeastern Argentina. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(2), e0005351.

Moreira-Soto, A., Soto-Garita, C., & Corrales-Aguilar, E. (2017). Neotropical primary bat cell lines show restricted dengue virus replication. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 101-105.

Moreira Marrero, L., Botto Nuñez, G., Frabasile, S., & Delfraro, A. (2022). *Alphavirus* Identification in Neotropical Bats. *Viruses*, 14(2), 269.

Moreira-Soto, A., Carneiro, I. D. O., Fischer, C., Feldmann, M., Kümmerer, B. M., Silva, N. S., ... & Drexler, J. F. (2018). Limited evidence for infection of urban and peri-urban nonhuman primates with Zika and chikungunya viruses in Brazil. *Mosphere*, 3(1), 10-1128.

Murakoshi, F., Recuenco, F. C., Omatsu, T., Sano, K., Taniguchi, S., Masangkay, J. S., ... & Kato, K. (2016). Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Eimeria* species in Philippine bats. *Parasitology Research*, 115(5), 1863-1869.

Murugesan, A., & Manoharan, M. (2020). Dengue virus. In *Emerging and reemerging viral pathogens* (pp. 281-359). Academic Press.

Muñoz-García, C., Rendón-Franco, E., López-Díaz, O., Ruiz Romero, R., Aréchiga-Ceballos, N., Villanueva-García, C., ... & Arellano-Aguilar, O. (2016). Colecta y conservación de muestras de fauna silvestre en condiciones de campo. Ciudad de México, Universidad Autónoma Metropolitana.

Nakgoi, K., Nitatpattana, N., Wajjwalku, W., Pongsopawijit, P., Kaewchot, S., Yoksan, S., ... & González, J. P. (2014). Dengue, Japanese encephalitis and Chikungunya virus antibody prevalence among captive monkey (*Macaca nemestrina*) colonies of Northern Thailand. *American journal of primatology*, 76(1), 97-102.

Nguyet, M. N., Duong, T. H., Trung, V. T., Nguyen, T. H., Tran, C. N., Long, V. T., Dui, leT., Nguyen, H. L., Farrar, J. J., Holmes, E. C., Rabaa, M. A., Bryant, J. E., Nguyen, T. T., Nguyen, H. T., Nguyen, L. T., Pham, M. P., Nguyen, H. T., Luong, T. T., Wills, B., Nguyen, C. V., ... Simmons, C. P. (2013). Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9072–9077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303395110>

Nanaware, N., Banerjee, A., Mullick Bagchi, S., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2021). Dengue virus infection: a tale of viral exploitations and host responses. *Viruses*, 13(10), 1967.

Narayanan, K., & Makino, S. (2013). Interplay between viruses and host mRNA degradation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6-7), 732-741.

Neuweiler, G. (2000). *The biology of bats*. Oxford University Press, USA.

NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

NOM-059-NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.

O'connor, J. L., Rowan, L. C., & Lawrence, J. J. (1955). Relationships between the flying fox (genus *Pteropus*) and arthropod-borne fevers of North Queensland. *Nature*, 176(4479), 472-472.

OhAinle, M., Balmaseda, A., Macalalad, A. R., Tellez, Y., Zody, M. C., Saborío, S., ... & Harris, E. (2011). Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Science translational medicine*, 3(114), 114ra128-114ra128.

OIE (The World Organisation for Animal Health). (2017). Terrestrial animal health code.

Okia, N. O., George, P. V., Tupei, P. M., Kafuko, G. W., Lule, M., Sekyalo, E., & Mukuye, A. (1971). Arbovirus survey in wild birds in Uganda. *East African medical journal*, 48(12), 725–731.

Organización Mundial de la Salud (2020). Enfermedades transmitidas por vectores.

Organización Mundial de la Salud (2023). Partes sobre brotes epidémicos; dengue: situación mundial.

Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Dengue en la Región de las Américas. 16 de febrero del 2024. Washington, D.C. OPS/OMS. 2024.

Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Riesgo de brotes de dengue por la mayor circulación de DENV-3 en la Región de las Américas. 7 de febrero del 2025. Washington, D.C.: OPS/OMS; 2025.

Orihuela, J. (2011). Skull variation of the vampire bat *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae): Taxonomic implications for the Cuban fossil vampire bat *Desmodus puntajudensis*. Chiroptera Neotropical, 17(1), 963-976

O'shea, T. J., Cryan, P. M., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Hayman, D. T., Luis, A. D., ... & Wood, J. L. (2014). Bat flight and zoonotic viruses. Emerging infectious diseases, 20(5), 741.

Oteo, José A, Nava, Santiago, Sousa, Rita de, Mattar, Salim, Venzal, José M, Abarca, Katia, Labruna, Marcelo B, & Zavala-Castro, Jorge. (2014). Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. Revista chilena de infectología, 31(1), 54-65.

Pando-Robles, V., Alvarez-Obregón, J., del Castillo-Flores, G. D., González-Roldán, J. F., Raga-Sarabia, E. S., González-Acosta, C., & Méndez-Galván, J. F. (2024). Epidemiological and economic burden of Dengue in Mexico: Data analysis from 2010 to 2020. Veterinaria México OA, 11.

Patkar, C. G., & Kuhn, R. J. (2008). Yellow fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. Journal of virology, 82(7), 3342-3352.

Pauvolid-Corrêa, A., Campos, Z., Juliano, R., Velez, J., Nogueira, R. M. R., & Komar, N. (2014). Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. PLoS neglected tropical diseases, 8(2), e2706.

Peiris, J. S. M., Dittus, W. P. J., & Ratnayake, C. B. (1993). Seroepidemiology of dengue and other arboviruses in a natural population of toque macaques (*Macaca*

*sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. Journal of medical primatology, 22(4), 240-245.

Perea-Martínez, L., Moreno-Sandoval, H. N., Moreno-Altamirano, M. M., Salas-Rojas, M., García-Flores, M. M., Aréchiga-Ceballos, N., ... & Aguilar-Setién, A. (2013). Experimental infection of *Artibeus intermedius* bats with serotype-2 dengue virus. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 36(2), 193-198.

Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. Current opinion in microbiology, 11(4), 369-377.

Phelps, K. L., Hamel, L., Alhmoud, N., Ali, S., Bilgin, R., Sidamonidze, K., Urushadze, L., Karesh, W., & Olival, K. J. (2019). Bat Research Networks and Viral Surveillance: Gaps and Opportunities in Western Asia. Viruses, 11(3), 240.

Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. Nature microbiology, 5(6), 796-812.

Piksa, K., Stańczak, J., Biernat, B., Górz, A., Nowak-Chmura, M., & Siuda, K. (2016). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group rickettsiae in hard ticks (Acari, Ixodidae) parasitizing bats in Poland. Parasitology Research, 115(4), 1727-1731.

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. Journal of medical entomology, 37(6), 965-967.

Poltep, K., Phadungsombat, J., Nakayama, E. E., Kosoltanapiwat, N., Hanboonkunupakarn, B., Wiriyarat, W., ... & Leaungwutiwong, P. (2021). Genetic diversity of dengue virus in clinical specimens from Bangkok, Thailand, during 2018–2020: Co-circulation of all four serotypes with multiple genotypes and/or clades. Tropical medicine and infectious disease, 6(3), 162.

Porterfield, J. S. (1986). Comparative and historical aspects of the Togaviridae and Flaviviridae. In The Togaviridae and Flaviviridae (pp. 1-19). Boston, MA: Springer New York.

Postler, T. S., Beer, M., Blitvich, B. J., Bukh, J., De Lamballerie, X., Drexler, J. F., ... & Kuhn, J. H. (2023). Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. Archives of virology, 168(9), 224.

- Price, J. L. (1978). Serological evidence of infection of Tacaribe virus and arboviruses in Trinidadian bats. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27(1 Pt 1), 162-167.
- Quan, P. L., Firth, C., Conte, J. M., Williams, S. H., Zambrana-Torrelio, C. M., Anthony, S. J., ... & Lipkin, W. I. (2013). Bats are a major natural reservoir for hepatitis viruses and pegiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(20), 8194-8199.
- Racey, P. A. (2011). Ecological and behavioral methods for the study of bats (Vol. 162, No. 1, pp. 243-243). Oxford University Press.
- Rajagopalan, P. K., Paul, S. D., & Sreenivasan, M. A. (1969). Isolation of Kyasanur forest disease virus from the insectivorous bat, *Rhinolophus rouxi* and from *Ornithodoros* ticks. *The Indian journal of medical research*, 57(5), 805-808.
- Ramí, G., Jardon-Xicotencatl, S., Olave-Leyva, I., Zepeda-Bastida, A., & Ocampo-Ló, J. (2024). Descriptive and Comparative Histology of the Urinary System of the Hematophagous Bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata*. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 14(7), 180-191.
- Ramírez-Pulido, J., González-Ruiz, N., Gardner, A. L., & Arroyo-Cabral, J. (2014). List of recent land mammals of Mexico, 2014.
- Ranaivoson, H. C., Héraud, J. M., Goethert, H. K., Telford, S. R., Rabetafika, L., & Brook, C. E. (2019). Babesial infection in the Madagascan flying fox, *Pteropus rufus* É. Geoffroy, 1803. *Parasites & Vectors*, 12, 1-13.
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology journal*, 13, 1-10.
- Reeves, W. K., Streicker, D. G., Loftis, A. D., & Dasch, G. A. (2006). Serologic survey of *Eptesicus fuscus* from Georgia, USA for *Rickettsia* and *Borrelia* and laboratory transmission of a *Rickettsia* by bat ticks. *Journal of Vector Ecology*, 31(2), 386-389.
- Reeves, W. K., Beck, J., Orlova, M. V., Daly, J. L., Pippin, K., Revan, F., & Loftis, A. D. (2016). Ecology of bats, their ectoparasites, and associated pathogens on Saint Kitts Island. *Journal of Medical Entomology*, 53(5), 1218-1225.
- Reeves, W. K., Mans, B. J., Durden, L. A., Miller, M. M., Gratton, E. M., & Laverty, T. M. (2020). *Rickettsia hoogstraalii* and a *Rickettsiella* from the Bat Tick *Argas transgariepinus*, in Namibia. *The Journal of Parasitology*, 106(5), 663-669.

Renner, M., Dejnirattisai, W., Carrique, L., Martin, I. S., Karia, D., Ilca, S. L., ... & Grimes, J. M. (2021). Flavivirus maturation leads to the formation of an occupied lipid pocket in the surface glycoproteins. *Nature Communications*, 12(1), 1238.

Rojas Arroyo, N. A. (2018). Correlación clínico-epidemiológica entre el serotipo infectante de virus dengue, las formas graves y defunciones por dengue en México, 2016-2018 (Tesis de especialización en Epidemiología). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Romero-Barrera, C. E., Osorio-Rodríguez, A. N., & Juárez-Agis, A. (2021). Distribución, abundancia, control y registros de casos de murciélagos vampiro, *Desmodus rotundus* (E. geoffroy), infectados de rabia en ambientes pecuarios de guerrero, México: Population control of the vampire bat. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 7(1)

Rowan, L. C., & O'connor, J. L. (1957). Relationship between some coastal fauna and arthropod-borne fevers of North Queensland. *Nature*, 179(4563), 786-787.

Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian journal of microbiology*, 67(10), 687-702.

Rudnick, A. (1965). Studies of the ecology of dengue in Malaysia: a preliminary report. *Journal of medical entomology*, 2(2), 203-208.

Sakalauskas, P., Kaminskienė, E., Bukauskaitė, D., Eigirdas, V., Snegiriovaitė, J., Mardosaitė-Busaitienė, D., & Paulauskas, A. (2024). Molecular detection of *Babesia vesperuginis* in bats from Lithuania. *Ticks and tick-borne diseases*, 15(1), 102283.

Sánchez-Montes, S., Guzmán-Cornejo, C., Martínez-Nájera, Y., Becker, I., Venzal, J. M., & Labruna, M. B. (2016). *Rickettsia lusitaniae* associated with *Ornithodoros yumatensis* (Acari: Argasidae) from two caves in Yucatán, México. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(6), 1097–1101.

Sánchez-Seco, M. P., Rosario, D., Quiroz, E., Guzmán, G., & Tenorio, A. (2001). A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *Journal of virological methods*, 95(1-2), 153-161.

Sánchez-Seco, M. P., Rosario, D., Domingo, C., Hernández, L., Valdés, K., Guzmán, M. G., & Tenorio, A. (2005). Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of virological methods*, 126(1-2), 101-109.

Santiago, G. A., Vergne, E., Quiles, Y., Cosme, J., Vazquez, J., Medina, J. F., ... & Muñoz-Jordán, J. L. (2013). Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(7), e2311.

Santos, E. C., Moura-Martiniano, N. O., Vilela, R. V., Lucio, C. S., Silva, A. F., Oliveira, S. V., & Gazeta, G. S. (2020). *Hepatozoon* infecting bats in the Southeastern Brazilian rainforest. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(3), 693-697.

Scheffer, K. C., Barros, R. F. D., Keila Iamamoto, K., Mori, E., Asano, K. M., Lima, J. Y. D. O., ... & Fahl, W. D. O. (2022). *Desmodus rotundus*-biología y comportamiento (Doctoral dissertation, Instituto Pasteur).

SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.

Sétien, A. A., Brochier, B., Tordo, N., De Paz, O., Desmettre, P., Péharpré, D., & Pastoret, P. P. (1998). Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine*, 16(11-12), 1122-1126.

Sikes, R. S., & Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists (2016). 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of mammalogy*, 97(3), 663–688.

Sil-Berra, L. M., López, M. A., Márquez-Medero, M. A., & Cervantes-Cruz, J. M. (2022). De México para el mundo... los murciélagos endémicos. *Therya ixmana*, 1(1), 29-31.

Simmons, N.B. and A.L. Cirranello. 2025. Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database. Version 1.6. doi: 10.5281/zenodo.12802826

Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., ... & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *Journal of General Virology*, 98(1), 2-3. Recuperado de: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae>

Sinha, S., Singh, K., Ravi Kumar, Y. S., Roy, R., Phadnis, S., Meena, V., ... & Verma, B. (2024). Dengue virus pathogenesis and host molecular machineries. *Journal of Biomedical Science*, 31(1), 43.

SINAVE (2015) Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue.

SINAVE (2017) Panorama Epidemiológico de Dengue, 2017.

SINAVE. (2024). Aviso Epidemiológico: Incremento de casos de Dengue en México (p. 7).

SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue con Información al 9 de junio de 2025 y a la semana 23 de 2024.

Socolovschi, C., Kernif, T., Raoult, D., & Parola, P. (2012). *Borrelia, Rickettsia, and Ehrlichia Species in Bat Ticks, France, 2010*. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 1966-1975.

Sotomayor-Bonilla, J., Chaves, A., Rico-Chávez, O., Rostal, M. K., Ojeda-Flores, R., Salas-Rojas, M., Aguilar-Setien, Á., Ibáñez-Bernal, S., Barbachano-Guerrero, A., Gutiérrez-Espeleta, G., Aguilar-Faisal, J. L., Aguirre, A. A., Daszak, P., & Suzán, G. (2014). Dengue virus in bats from southeastern Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91(1), 129–131.

Sotomayor-Bonilla, J., García-Suárez, O., Cigarroa-Toledo, N., Cetina-Trejo, R. C., Espinosa-García, A. C., Sarmiento-Silva, R. E., ... & Suzán, G. (2018). Survey of mosquito-borne flaviviruses in the Cuitzmala River Basin, Mexico: do they circulate in rodents and bats? *Tropical medicine and health*, 46, 1-5.

Souza, A. C. F., Santos, F. C., Bastos, D. S. S., Sertorio, M. N., Teixeira, J. P. G., Fernandes, K. M., & Machado-Neves, M. (2018). Reproductive functions in *Desmodus rotundus*: A comparison between seasons in a morphological context. *PLoS One*, 13(10), e0205023.

Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J., & Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of virology*, 71(11), 8475-8481.

Stone, D., Lyons, A. C., Huang, Y. J., Vanlandingham, D. L., Higgs, S., Blitvich, B. J., ... & Cheetham, S. (2018). Serological evidence of widespread exposure of Grenada fruit bats to chikungunya virus. *Zoonoses and public health*, 65(5), 505-511.

Suárez-Galaz, A. R., Panti-May, J. A., & Torres-Castro, M. Murciélagos de México y géneros bacterianos con importancia para la salud pública o animal† [Bats from Mexico and bacteria genera with importance for public or animal health].

Subudhi, S., Rapin, N., & Misra, V. (2019). Immune system modulation and viral persistence in bats: understanding viral spillover. *Viruses*, 11(2), 192.

Szubert-Kruszyńska, A., Stańczak, J., Cieniuch, S., Podsiadły, E., Postawa, T., & Michalik, J. (2019). *Bartonella* and *Rickettsia* infections in haematophagous *Spinturnix myoti* mites (Acari: Mesostigmata) and their bat host, *Myotis myotis* (Yangochiroptera: Vespertilionidae), from Poland. *Microbial Ecology*, 77(3), 759-768.

Tahir, D., Socolovschi, C., Marié, J. L., Ganay, G., Berenger, J. M., Bompar, J. M., ... & Parola, P. (2016). New *Rickettsia* species in soft ticks *Ornithodoros hasei* collected from bats in French Guiana. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(6), 1089-1096.

Tan, T. Y., Fibriansah, G., & Lok, S. M. (2020). Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles. *PLoS Pathogens*, 16(5), e1008542.

Taylor, M. (2019). *Bats: an illustrated guide to all species*. Ivy Press.

Tendu, A., Hughes, A. C., Berthet, N., & Wong, G. (2022). Viral Hyperparasitism in Bat Ectoparasites: Implications for Pathogen Maintenance and Transmission. *Microorganisms*, 10(6), 1230.

Thongyuan, S., & Kittayapong, P. (2017). First evidence of dengue infection in domestic dogs living in different ecological settings in Thailand. *PloS one*, 12(8), e0180013.

Tompa, E., Jaenson, T. G., & Wilhelmsson, P. (2023). First records of possibly human pathogenic *Rickettsia* species in bat ticks, *Carios vespertilionis*, in Sweden. *Microorganisms*, 11(2), 357.

Torres-Mejía, X., Pérez-Rivero, J. J., Olvera-Vargas, L. A., Barragán-Hernández, E. Á., Martínez-Maya, J. J., & Aguilar-Setién, Á. (2021). La coexistencia de *Desmodus rotundus* con la población humana en San Luis Potosí, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(3), 694-704.

Trajano, E., & De Vivo, M. (1991). *Desmodus draculae* Morgan, Linares, and Ray, 1988, reported for southeastern Brasil, with paleoecological comments (Phyllostomidae, Desmodontinae). *Mammalia (Paris)*, 55(3), 456-459.

Turmelle, A. S., & Olival, K. J. (2009). Correlates of viral richness in bats (order Chiroptera). *EcoHealth*, 6, 522-539.

Ulloa, A., Bermúdez, S., Rosario-Cruz, R., García-Rejón, J. E., & Baak-Baak, C. (2019). Rickettsiosis en México, revisión y estado actual del género *Rickettsia* en el país. *Algunas Enfermedades Infecciosas en México: Morbilidad y Mortalidad*, 19-40.

Underwood, W., & Anthony, R. (2020). AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Retrieved on March, 2013(30), 2020-1.

Usme Ciro, J. A. (2022). Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina, Santa Marta.

Valentine, M. J., Murdock, C. C., & Kelly, P. J. (2019). Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasites & vectors*, 12, 1-18.

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

Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2008). The history and evolution of human dengue emergence. *Advances in virus research*, 72, 1-76.

Venzal, J. & Nava, S. (2011). "El género *Rickettsia* como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica".

Vicente-Santos, A., Moreira-Soto, A., Soto-Garita, C., Chaverri, L. G., Chaves, A., Drexler, J. F., ... & Corrales-Aguilar, E. (2017). Neotropical bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5), e0005537.

Villa-Ramírez, B. (1966). Los murciélagos de México: su importancia en la economía y la salubridad: su clasificación sistemática (No. QL 737. C5. V54).

Villa-Ramírez, B. (1976). Biología de los murciélagos hematófagos. *Ciencia Veterinaria*, 1, 85-101.

Wei, C. Y., Wang, X. M., Wang, Z. S., Wang, Z. H., Guan, Z. Z., Zhang, L. H., ... & Wang, H. (2020). High prevalence of *Babesia microti* in small mammals in Beijing. *Infectious diseases of poverty*, 9, 1-11.

Whitaker, J. O., Jr, Ritzi, C., & Dick, C. W. (2009b). Collecting and preserving ectoparasites for ecological study. ResearchGate. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/266020833\\_Collecting\\_and\\_preserving\\_ectoparasites\\_for\\_ecological\\_study](https://www.researchgate.net/publication/266020833_Collecting_and_preserving_ectoparasites_for_ecological_study)

Wolfe, N. D., Kilbourn, A. M., Karesh, W. B., Rahman, H. A., Bosi, E. J., Cropp, B. C., ... & Gubler, D. J. (2001). Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 64(5), 310-316.

Wu, Z., Liu, B., Du, J., Zhang, J., Lu, L., Zhu, G., ... & Jin, Q. (2018). Discovery of diverse rodent and bat pestiviruses with distinct genomic and phylogenetic characteristics in several Chinese provinces. *Frontiers in microbiology*, 9, 2562.

Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., ... & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A protein orchestrates virus assembly. *Cell host & microbe*, 26(5), 606-622.

Xu, Z., Feng, Y., Chen, X., Shi, M., Fu, S., Yang, W., Liu, W. J., Gao, G. F., & Liang, G. (2022). Virome of Bat-Infesting Arthropods: Highly Divergent Viruses in Different Vectors. *Journal of virology*, 96(4), e0146421.

Yu, I. M., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2009). Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of virology*, 83(23), 12101-12107.

Yuwono, J., Suharyono, W., Koiman, I., Tsuchiya, Y., & Tagaya, I. (1984). Seroepidemiological survey on dengue and Japanese encephalitis virus infections in Asian monkeys. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 15(2), 194-200.

Zarza, H., Martínez-Meyer, E., Suzán, G., & Ceballos, G. (2017). Geographic distribution of *Desmodus rotundus* in Mexico under current and future climate change scenarios: Implications for bovine paralytic rabies infection. *Veterinaria México OA*, 4(3), 10-25.

Zavala, R., Devesa, M., Loureiro, C. L., Pernalete, J. M., Henriquez, A., Liprandi, F., & Pujol, F. H. (2006). Prevalence of antibodies to dengue virus, hepadnavirus and rotavirus in non-human primates. *Acta Científica Venezolana*, 51 (1), 22–27.

Zhang HaoYan, Z. H., Yang XinKe, Y. X., & Li GuiYing, L. G. (1998). Detection of dengue virus genome RNA in some kinds of animals caught from dengue fever endemic areas in Hainan Island with reverse transcription-polymerase chain reaction.

Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J. M., Bi, G., Zhang, Q., Schein, S., & Zhou, Z. H. (2013a). Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature structural & molecular biology*, 20(1), 105–110. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2463>

Zhang, X., Zhang, Y., Jia, R., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2021). Structure and function of capsid protein in flavivirus infection and its applications in the development of vaccines and therapeutics. *Veterinary research*, 52, 1-14.<sup>2</sup>

Zhao, R., Wang, M., Cao, J., Shen, J., Zhou, X., Wang, D., & Cao, J. (2021). Flavivirus: from structure to therapeutics development. *Life*, 11(7), 615.

Zhao, S., Yang, M., Liu, G., Hornok, S., Zhao, S., Sang, C., ... & Wang, Y. (2020). Rickettsiae in the common pipistrelle *Pipistrellus pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae) and the bat soft tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae). *Parasites & Vectors*, 13(1), 10.

Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal models of dengue virus infection. *Viruses*, 4(1), 62-82.